

# **Analyse der Funktion des Photorezeptors**

## ***Channelrhodopsin 1***

### **der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii***

#### **Dissertation**

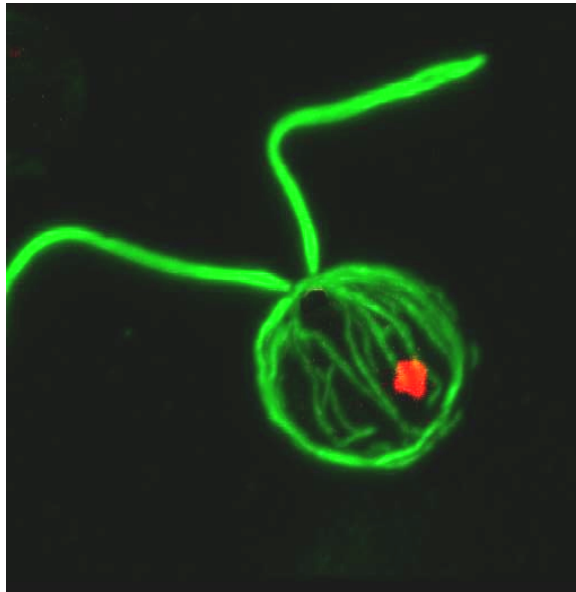
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin,  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Peter Berthold**

aus Regensburg

Regensburg, Februar 2006



Immunfluoreszenz-Aufnahme einer *C. reinhardtii*-Zelle mit dem Photorezeptor *Channelrhodopsin 1* (rot) und dem Zytoskelett (grün).

Promotionsgesuch eingereicht am 27. Januar 2006

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Peter Hegemann.

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Hegemann

2. Gutachter: Prof. Dr. Charlotte Förster

3. Prüfer: Prof. Dr. Günther Hauska

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2002 bis September 2005 am Institut für Biochemie I der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Peter Hegemann angefertigt.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>4-7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>10-18</b>
2.1 Der Organismus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	10
2.2 Das optische System von <i>C. reinhardtii</i> .....	11
2.3 Die Bewegungsreaktionen von <i>C. reinhardtii</i> auf Licht.....	13
2.4 Photorezeption in <i>C. reinhardtii</i> .....	14
2.5 Aufgabenstellung .....	18
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>19-59</b>
3.1 Herstellung polyklonaler anti-ChR-Antikörper .....	19
3.1.1 Heterologe Expression von ChR1- und ChR2-Antigenen in <i>E. coli</i> .....	19
3.1.2 Affinitätsreinigung der polyklonalen Rohseren .....	23
3.1.2.1 Heterologe Expression von ChR1-/ChR2-Proteinfragmenten .....	23
3.1.2.2 Test der gereinigten anti-ChR-Antikörper auf Kreuzreaktion.....	25
3.2 Test der gereinigten anti-ChR-Antikörper mit Zellextrakten von <i>C. reinhardtii</i> .....	26
3.3 Expression von <i>Channelrhodopsin 1</i> in <i>C. reinhardtii</i> .....	27
3.3.1 Standardisierung der Bedingungen für Westernblot-Analysen.....	27
3.3.2 Ermittlung der experimentell bedingten Streuung der Signalstärke der ChR1-Bande .....	29
3.3.3 ChR1 ist in der Zellmembran lokalisiert.....	30
3.3.4 Disulfidbindungen beeinflussen die Konformation von ChR1 .....	31
3.3.5 ChR1-Expression in <i>C. reinhardtii</i> unter verschiedenen Wachstums- bedingungen.....	32
3.3.6 Kinetik der ChR1-Expression nach Dunkel-Licht-Wechsel .....	33
3.4 Expression von <i>Channelrhodopsin 2</i> in <i>C. reinhardtii</i> .....	35
3.4.1 Der anti-ChR2-Antikörper erkennt zwei Banden bei etwa 60 kDa .....	35
3.5 ChR2 ist in der Zellmembran lokalisiert .....	37
3.5.1 <i>cw2</i> -Gameten enthalten nur eine geringe Menge an ChR2-Protein .....	38

3.6	Analyse der Funktion von <i>Channelrhodopsin 1</i> durch RNA- interference .....	39
3.6.1	ChR1-RNAi mit dem Plasmid pAS-CSOA .....	40
3.6.2	ChR1-RNAi mit dem Plasmid pPB-ASChR1 .....	41
3.7	Physiologische Analyse der ChR1-RNAi-Transformanten .....	44
3.7.1	Die ChR1-Reduktion ist in H-17 Gameten besonders stark ausgeprägt ....	45
3.7.2	Die Reduktion von ChR1 führt zum Verlust der Phototaxis bei Zellen der Mutante H-17 .....	46
3.7.3	Die Gameten der Mutante H-17 zeigen keine photophobische Reaktion ...	47
3.7.4	Untersuchung der phototaktischen Orientierung der Mutante H-17 mittels Lichtstreuung .....	49
3.7.4.1	Lichtstreusignale von cw2-Zellen .....	50
3.7.4.2	Die Reduktion von ChR1 führt zum Verlust der phototaktischen Orientierung in Gameten der Mutante H-17 .....	52
3.7.5	ChR1-Mutanten zeigen reduzierte Photoströme .....	53
3.8	Lokalisation von ChR1 und ChR2 durch Immunfluoreszenz .....	56
3.8.1	Immunolokalisation von ChR1 .....	57
3.8.2	Immunolokalisation von ChR2 .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>60-71</b>
4.1	Expression von <i>Channelrhodopsin 1</i> in <i>C. reinhardtii</i> .....	60
4.2	Lichtabhängige Expression von ChR1 .....	61
4.3	Expression von ChR2 .....	61
4.4	Cysteine beeinflussen die Konformation von ChR1 und ChR2 .....	62
4.5	Gründe für die geringe Motilität der ChR1-RNAi-Transformanten .....	65
4.6	ChR1 steuert Phototaxis und photophobische Antwort .....	66
4.7	ChR1 beeinflusst die Photoströme .....	67
4.8	Lokalisation von ChR1 und ChR2 im Bereich des Augenflecks .....	69
4.9	Mögliche Funktion von <i>Channelrhodopsin 2</i> .....	70
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>72-98</b>
5.1	Material .....	72
5.1.1	Organismen und Plasmide .....	72
5.1.2	Biochemikalien .....	73
5.2	Kultur von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	74
5.2.1	Kultivierung vegetativer Zellen .....	74
5.2.2	Kultur von vegetativen Zellen in 24-Well- bzw. 6-Well-Platten .....	75
5.2.3	Differenzierung von vegetativen Zellen zu Gameten .....	75

5.3	Transformation von <i>C. reinhardtii</i> .....	75
5.4	Präparation von Gameten-Autolysin .....	76
5.5	Molekularbiologische Methoden.....	77
5.5.1	Bakterienkultur .....	77
5.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	77
5.5.3	Gelelektrophorese von DNA.....	78
5.5.4	Reinigung von DNA aus Agarosegelen und Lösungen .....	78
5.5.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	78
5.5.6	Klonierung von DNA-Fragmenten .....	80
5.5.6.1	Restriktionsverdau von DNA .....	80
5.5.6.2	Ligation von DNA-Fragmenten.....	80
5.5.6.3	Transformation von <i>E. coli</i> .....	80
5.5.7	Expression und Reinigung von Proteinfragmenten aus <i>E. coli</i> .....	81
5.5.7.1	Reinigung des ChR1-MBP-Fusionsproteins.....	81
5.5.7.2	Reinigung von Proteinfragmenten aus <i>inclusion bodies</i> .....	82
5.5.7.3	Proteinfragmente mit C-terminalem His-tag .....	82
5.5.8	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	83
5.5.9	Herstellung von Membranfraktionen aus <i>C. reinhardtii</i> Zellextrakten .....	84
5.6	Immunologische Methoden.....	84
5.6.1	Herstellung von polyklonalen Antisera aus Kaninchen.....	84
5.6.2	Affinitätsreinigung der Antikörper .....	84
5.6.3	Westernblot-Analysen .....	85
5.6.4	Wiederablösen ( <i>Strippen</i> ) der Antikörper von Nitrocellulosemembranen ...	86
5.6.5	Quantifizierung der Westernblot-Signale .....	87
5.6.6	Immunofluoreszenz-Analysen .....	87
5.6.6.1	Präparation der Zellen.....	87
5.7	Elektrophysiologische Messungen.....	89
5.7.1	Das Messprinzip.....	89
5.7.2	Der Messaufbau .....	89
5.7.3	Datenaufnahme und Auswertung .....	89
5.7.4	Die Messpipetten.....	90
5.7.5	Der Messpuffer.....	91
5.7.6	Chlorieren der Silberelektroden.....	91
5.7.7	Unterdruckapplikation.....	92
5.7.8	Applikation und Variation des Reizlichtes.....	92
5.7.9	Vorbereitung der Zellen für die Saugelektrodenmessung .....	93
5.7.10	Durchführung der Messungen .....	93
5.8	Bewegungsanalysen.....	94
5.8.1	Phototaxis-Assay bei Tageslicht.....	94
5.8.2	Analyse der photophobischen Reaktion mittels Bildverarbeitung .....	94
5.8.2.1	Messaufbau.....	94
5.8.2.2	Der Messpuffer.....	95
5.8.2.3	Vorbereitung der Zellen.....	95
5.8.2.4	Auswertung .....	95

5.8.3	Lichtstreuanalysen .....	96
5.8.3.1	Aufbau und Funktion der Lichtstreu-Apparatur.....	96
5.8.3.2	Prinzip der Lichtstreuung.....	97
5.8.3.3	Der Messpuffer.....	97
5.8.3.4	Vorbereitung der Zellen für die Lichtstreuungen.....	98
5.8.3.5	Durchführung der Lichtstreuungen .....	98
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99-105</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>106</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Amper
BAPTA	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure
°C	Grad Celsius
ChR	Channelrhodopsin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HSA	Hochsalz-Acetat Medium
IgG	Immunglobulin G
I <sub>FF</sub>	Flagellenstrom
I <sub>P1</sub>	transienter Photorezeptorstrom
I <sub>P2</sub>	transienter Protonenstrom
I <sub>SS</sub>	stationärer Protonenstrom
J	Joule
l	Liter
λ	Wellenlänge
μ	Mikro-
n	Nano
NMM	Stickstoff-Mangel-Medium
p.A.	<i>per analysi</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RT	Raumtemperatur (20°C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
U	Units
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt



## 1 Zusammenfassung

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt sieben potentielle Photorezeptorproteine, die zur Familie der Rhodopsine gehören (Kateriya et al., 2004) und für lichtinduzierte Bewegungsantworten von *C. reinhardtii* verantwortlich sein könnten. Zwei der sieben Photorezeptorproteine konnten als lichtgesteuerte Ionenkanäle identifiziert werden (Nagel et al., 2002 und 2003), während die Funktion der anderen fünf Rhodopsine noch unbekannt ist. Dabei handelte es sich um den Protonenkanal *Channelrhodopsin 1* (ChR1) und den Kationen-Kanal *Channelrhodopsin 2* (ChR2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression dieser beiden Kanalrhodopsine in *Chlamydomonas* analysiert, und die Funktion von *Channelrhodopsin 1* an RNAi-Mutanten mit reduziertem ChR1-Gehalt untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Mittels in dieser Arbeit generierter polyklonaler Antikörper konnten die beiden Kanalrhodopsine in Zellextrakten von *Chlamydomonas* identifiziert und deren Expression charakterisiert werden. ChR1, das ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa besitzt, wird in Wildtypzellen (*CC124mt*) und in der Zellwandmutante *cw2* sowohl in vegetativen Zellen als auch in Gameten gleich stark exprimiert, wobei die Expression offensichtlich der circadianen Steuerung unterliegt.

ChR1 besitzt mindestens eine *in vivo* ausgebildete Disulfidbindung, die durch eine intermolekulare Wechselwirkung mit einem zweiten ChR1-Protein (Homodimer) oder mit einem noch unbekannten Protein (Heterodimer) zustande kommt.

ChR2 besitzt ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa und wird in Gameten der Zellwandmutante *cw2* nur schwach exprimiert.

Mittels der RNAi-Technik wurden 6 Transformanten mit reduziertem ChR1-Gehalt erzeugt. An diesen Mutanten konnte mittels Bewegungsanalysen gezeigt werden, dass es sich bei ChR1 um den Photorezeptor für die phototaktische und photophobische Reaktion handelt. Schließlich konnte in elektrophysiologischen Messungen gezeigt werden, dass ChR1 der Ionenkanal für den lichtgesteuerten stationären Protonenstrom  $I_{SS}$  ist, durch den der transiente  $Ca^{2+}$ -abhängige Photorezeptorstrom  $I_{P1}$  ausgelöst wird. Dabei zeigte der Strom  $I_{P1}$  eine deutlich lineare Abhängigkeit vom Strom  $I_{SS}$ .

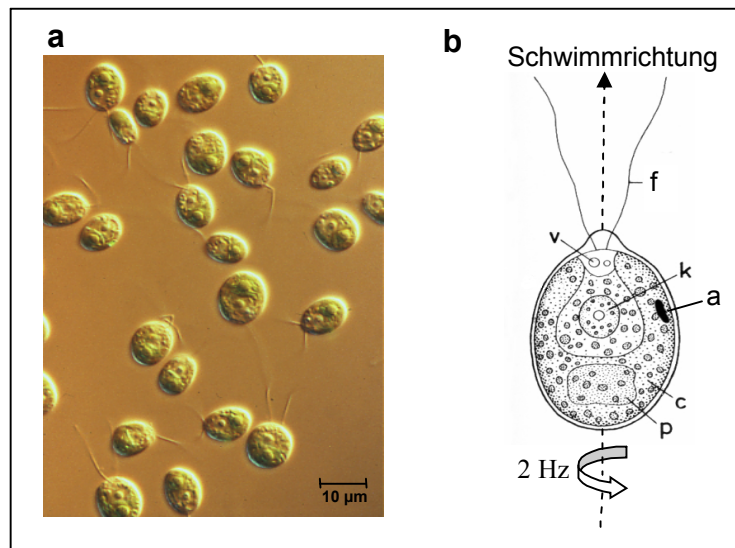
Immunofluoreszenz-Analysen ergaben, dass ChR1 und ChR2 innerhalb der Zelle im Bereich des Augenflecks von *Chlamydomonas* lokalisiert sind.

## 2 Einleitung

Viele biologische Prozesse im Tier- und Pflanzenreich werden von elektromagnetischer Strahlung, die ständig aus dem Weltall auf die Erde trifft, beeinflusst. Am wichtigsten für lebende Organismen ist dabei ein sehr schmales Band im Wellenlängenbereich von 380 bis 750 nm, das als sichtbares Licht bezeichnet wird, da es vom menschlichen Auge in Form von verschiedenen Farben wahrgenommen werden kann. Die Energie des Lichts kann zusammen mit dem Kohlendioxid der Atmosphäre von den grünen Pflanzen durch die Photosynthese in chemische Energie umgewandelt und in Form von Zuckermolekülen und anderen organischen Verbindungen gespeichert werden. Sehr hohe Bestrahlungsstärken, vor allem von sehr energiereichem kurzwelligem Licht, können auch zu einer irreversiblen Schädigung der organischen Moleküle führen. Deshalb war es für Organismen notwendig, im Laufe der Evolution verschiedene Photorezeptoren zu entwickeln, um sich veränderbaren Lichtbedingungen in Hinblick auf ein optimales Wachstum anpassen zu können.

### 2.1 Der Organismus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein einzelliger Vertreter der Familie der *Volvocaceae* (Abbildung 2.1). Die etwa zehn Mikrometer große Alge ist von einer Zellwand aus Glykoproteinen umgeben, die aus sieben Schichten besteht (Harris, 2001). Das Genom des zentralen Zellkerns setzt sich aus etwa  $10^8$  Basenpaaren zusammen und ist auf mindestens 16 Chromosomen verteilt (Harris, 1989). Die Zelle enthält einen becherförmigen Chloroplasten, der die Grünalge zur Photosynthese befähigt. Im Chloroplasten sind ein oder mehrere sog. Pyrenoide lokalisiert, in denen die  $\text{CO}_2$ -Fixierung und die Dunkelreaktion der Photosynthese stattfindet (Harris, 2001). Der Chloroplast enthält den lichtmikroskopisch sichtbaren Augenfleck, der im Bereich des Zelläquators lokalisiert ist und ein Bestandteil des Lichtwahrnehmungsapparates der Zelle darstellt. Die Grünalge besitzt am anterioren Pol zwei 10 – 20  $\mu\text{m}$  lange Peitschengeißeln, die nach dem Ruderschlagprinzip die Zelle mit einer Geschwindigkeit von etwa 120  $\mu\text{m/s}$  vorwärts treiben, wobei der Zellkörper dabei mit einer Frequenz von 2 Hz gegen den Uhrzeigersinn um die eigene Achse rotiert.



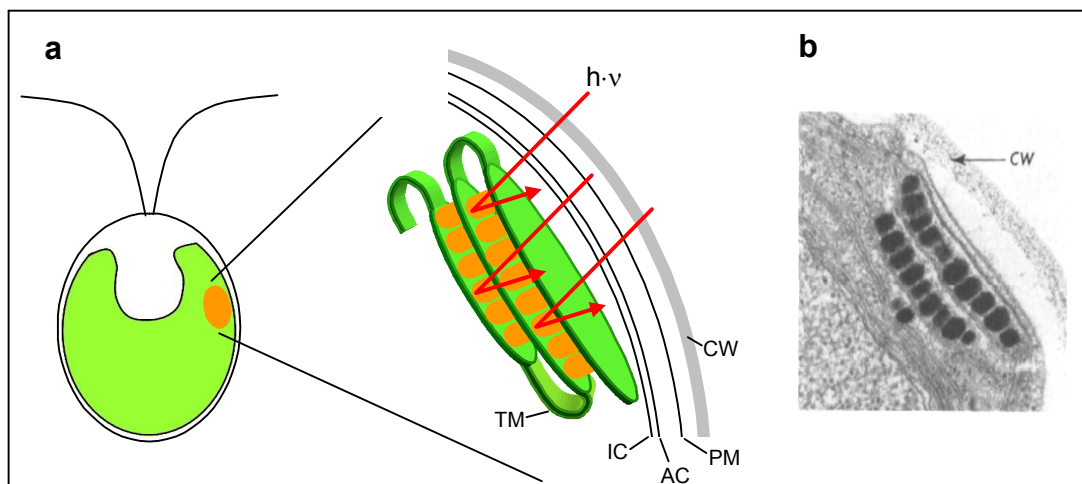
**Abbildung 2.1. Organisation der *C. reinhardtii* Zelle.** **a** Lichtmikroskopische Aufnahme von Zellen des Wildtypstammes *CC-124mt* im Phasenkontrast bei 40-facher Vergrößerung (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Karl Johnson, Haverford College, PA, USA). **b** Schematischer Aufbau der Zelle. c: becherförmiger Chloroplast. f: Flagellen. k: Zellkern. p: Pyrenoid. a: Augenfleck. v: Vakuole. (Modifiziert nach Strasburger, 1991, S. 614).

*C. reinhardtii* stellt einen physiologisch, genetisch und morphologisch gut charakterisierten Organismus dar und zeichnet sich gegenüber der ebenfalls einzelligen Hefe *Saccharomyces cerevisiae* außerdem durch den Besitz eines Photosyntheseapparates aus, weshalb der Organismus auch als „grüne Hefe“ bezeichnet wird (Goodenough, 1992). Aufgrund dieser Eigenschaften ist *C. reinhardtii* in den letzten Jahrzehnten zu einem beliebten Modellorganismus für zahlreiche fundamentale Fragestellungen avanciert. Dazu gehören Aufbau und Funktion des Chloroplasten (Grossman et al., 2004) und eukaryotischer Geißeln (Snell et al., 2004) sowie die Charakterisierung lichtabhängiger Bewegungsreaktionen und der daran beteiligten Photorezeptoren (Hegemann 1997; Kateriya et al., 2004).

## 2.2 Das optische System von *C. reinhardtii*

Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckten Forscher einen orangefarbenen Fleck in der äquatorialen Ebene des Zellkörpers von einzelligen Algen und bezeichneten diesen aufgrund der vermuteten Funktion als Augenfleck (Ehrenberg, 1883; Famintzin,

1878). Die Frage, ob der Augenfleck tatsächlich einen Lichtsensor darstellt, blieb zunächst unklar. Über 100 Jahre später postulierten Foster & Smyth (1980), dass der Augenfleck die Funktion eines optischen Apparates erfüllt, der das einfallende Licht reflektiert und auf eine Region der Zellmembran leitet, in der die Photorezeptoren vermutet wurden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass der Augenfleck von *C. reinhardtii* aus mehreren Schichten von carotinoidhaltigen Lipidvesikeln besteht (Abbildung 2.1 b), die im Stroma des Chloroplasten in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran lokalisiert sind und durch Thylakoidmembranen voneinander getrennt werden (Melkonian & Robenek, 1984). Die carotinoidhaltigen Vesikel besitzen einen höheren Brechungsindex als die Schichten der Thylakoidmembranen und sind in einem Abstand von etwa 125 nm angeordnet (Melkonian & Robenek, 1984). Trifft Licht senkrecht auf eine solche Struktur, so wird es an den Grenzflächen zwischen den Schichten mit unterschiedlichen Brechungsindices teilweise reflektiert. Dabei erfahren nur die reflektierten Lichtstrahlen eine positive Interferenz, deren Wellenlänge dem 4-fachen des Abstandes der optischen Schichten entspricht. Im Falle von *C. reinhardtii* trifft dies für Lichtstrahlen mit Wellenlängen von etwa 500 nm zu (Kreimer & Melkonian, 1990; Schaller & Uhl, 1997).

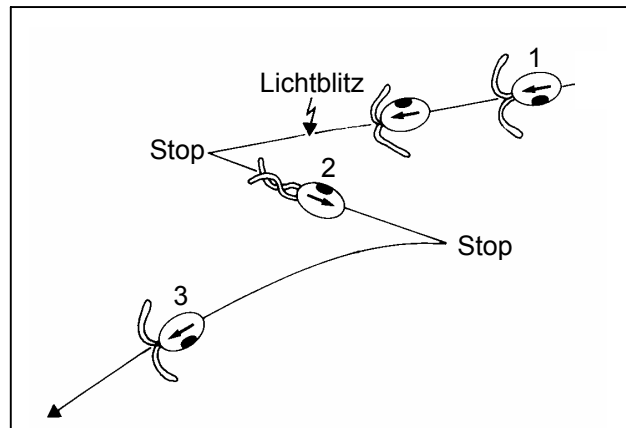


**Abbildung 2.2. Aufbau des Augenflecks von *C. reinhardtii*.** a Schematische Zeichnung. b Elektronenmikroskopische Aufnahme des Augenflecks (aus Gruber et al., 1974). Die carotinoidhaltigen Vesikel sind orange dargestellt. Die roten Pfeile symbolisieren einfallende Lichtstrahlen. PM Plasmamembran. AC: äußere Chloroplastenmembran. IC: innere Chloroplastenmembran. TM: Thylakoidmembran. CW: Zellwand.

Eine weitere Eigenschaft dieses auf Reflexion und Interferenz basierenden optischen Systems ist, dass die in der benachbarten Plasmamembran vermuteten Photorezeptoren von Licht, dass von der Rückseite auf den Augenfleck trifft, abgeschirmt werden, während Licht das direkt in den Augenfleck fällt durch positive Interferenz verstärkt wird. Hierbei liegt das Maximum bei senkrechtem Lichteinfall bei 500 nm und wird bei kleineren Einfallswinkeln in den kürzeren Wellenlängenbereich verschoben (Harz & Hegemann, 1998). Auf diese Weise kann die Grünalge die Richtung des einfallenden Lichts bestimmen.

### **2.3 Die Bewegungsreaktionen von *C. reinhardtii* auf Licht**

Wie die meisten beweglichen photosynthetischen Mikroorganismen zeigt auch *C. reinhardtii* eine Abhängigkeit seiner Bewegung von Licht, wobei man zwischen der Phototaxis und der photophobischen Reaktion unterscheidet. Die Phototaxis stellt eine gezielte Bewegungssteuerung in Abhängigkeit von der Lichtrichtung dar. Eine Bewegung auf die Lichtquelle zu wird als positive, von der Lichtquelle weg als negative Phototaxis bezeichnet. Bei ein und demselben Organismus findet man häufig positive Phototaxis bei niedrigen Bestrahlungsstärken, während bei hohen Lichtintensitäten negative Phototaxis auftritt (Häder et al., 1981). Das Vorzeichen hängt dabei zusätzlich von externen Faktoren wie der Konzentration von Kalzium- und Magnesium-Ionen (Halldal, 1957), der Adaptation an vorherrschende Lichtbedingungen (Mayer, 1968) sowie der Photosyntheserate (Takahashi & Watanabe, 1993) ab. Die Phototaxis von *C. reinhardtii* besitzt zudem eine Rhythmik, die von der circadianen Uhr der Grünalge gesteuert wird (Kondo et al., 1990; Mittag et al. 2005). Die photophobische Antwort von *C. reinhardtii* wird durch eine plötzliche Erhöhung (*step up*) oder Erniedrigung (*step down*) der Bestrahlungsstärke ausgelöst. Dabei stoppen die Algenzellen ihre Vorwärtsbewegung, schwimmen kurzzeitig rückwärts, stoppen erneut, um dann in eine zufällig gewählte Richtung wieder vorwärts zu schwimmen (Abbildung 2.3).



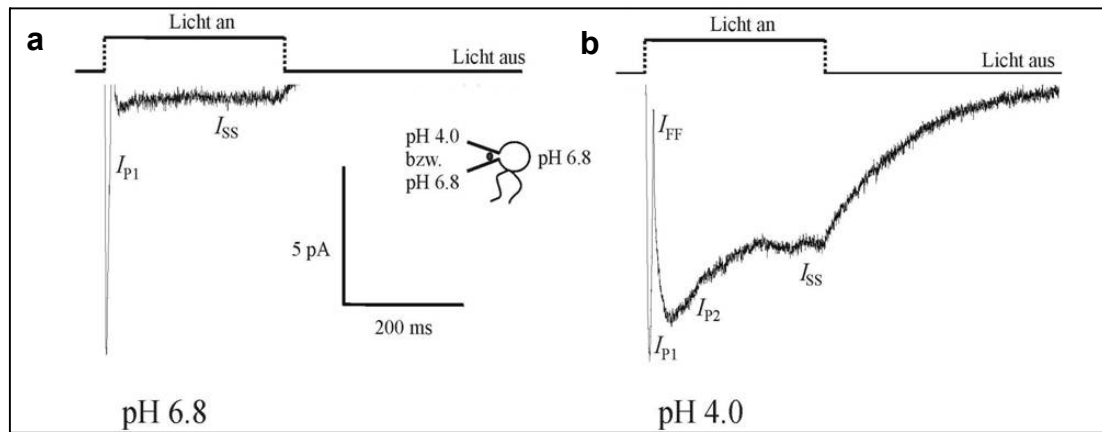
**Abbildung 2.3. Photopobische Reaktion von *C. reinhardtii*.** Die Grünalge schwimmt im Bruststil vorwärts und rotiert dabei gegen den Uhrzeigersinn um die eigene Achse (1). Nach einem Lichtblitz (Pfeil) stoppt die Alge und schwimmt kurzzeitig im Kraulstil rückwärts (2), stoppt erneut und setzt schließlich ihre Vorwärtsbewegung im Bruststil in eine neue Richtung fort (3). (Nach Hegemann et al., 1991).

Die lichtabhängigen Bewegungsreaktionen von *Chlamydomonas* wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv analysiert. In einem Schlüsselexperiment gelang Foster et al. (1984) der Nachweis, dass es sich bei dem Photorezeptor von *C. reinhardtii* um ein Rhodopsin handelt. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass durch Substitution einer „blinden“ Retinal-defizienten *C. reinhardtii*-Mutante mit extrazellulär zugesetztem Retinal die Wiederherstellung der phototaktischen Aktivität möglich war. Später konnte dies auch für die photopobische Reaktion bestätigt werden (Hegemann et al., 1985). Als Chromophor enthält dieses Rhodopsin *all-trans*-Retinal (Derguini et al., 1991). Sowohl die Phototaxis als auch die photopobische Reaktion besitzen ein Rhodopsin-Aktionsspektrum (Foster et al., 1984; Hegemann et al., 1985) mit einem Maximum von 503 nm bzw. 495 nm. Die Anwesenheit von Rhodopsin in *C. reinhardtii* konnte schließlich durch spektroskopische Analysen von gereinigten Membranen *in vitro* bestätigt werden (Beckmann & Hegemann, 1991).

## 2.4 Photorezeption in *C. reinhardtii*

Lichtinduzierte Ionenströme wurden erstmals an der einzelligen Grünalge *Haematococcus pluvialis* mittels der so genannten Saugelektrodenteknik gemessen (Litvin et al., 1978). Mittels solcher Saugelektrodenmessungen konnten auch in *C. reinhardtii* lichtinduzierte Kalzium- und Protonenströme identifiziert werden (Harz

& Hegemann, 1991; Ehlenbeck et al., 2002). Nach einem Lichtpuls mit einer Dauer von mehreren hundert Millisekunden können insgesamt drei unabhängige Stromkomponenten detektiert werden, die von unterschiedlichen Ionenkanälen verursacht werden. Als erstes tritt der transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Strom  $I_{P1}$  im Bereich des Augenflecks auf, der innerhalb von 10 – 15 ms deaktiviert und bei sättigender Lichtintensität eine Amplitude von 20 – 40 pA besitzt. Diesem transienten Strom folgt für die Dauer des Lichtpulses der ebenfalls im Augenfleck lokalisierte stationäre Protonenstrom  $I_{SS}$ , der bei pH 6.8 eine sehr kleine Amplitude besitzt. Erhöht man die Protonenkonzentration im Bereich des Augenflecks auf pH 4, so vergrößert sich die Amplitude von  $I_{SS}$  um ein Vielfaches (Ehlenbeck et al., 2002) und weist bei sättigender Lichtintensität einen erhöhten Anfangspeak auf. Dieser Anfangspeak entspricht dem transienten Protonenstrom  $I_{P2}$ , der bei Messungen mit erhöhter Protonenkonzentration nach Stimulation mit einem Lichtblitz gemessen werden kann. Beide Ströme zeigen eine lineare Abhängigkeit von der Lichtintensität im Bereich von etwa zwei Zehnerpotenzen. Die dritte messbare Stromkomponente ist der transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Flagellenstrom  $I_{FF}$ , der eine Alles-oder-Nichts-Antwort darstellt. Bei dem dafür verantwortlichen Ionenkanal handelt es sich um einen spannungsgesteuerten Kalziumkanal, der in der Flagellenmembran lokalisiert ist und aktiviert wird, wenn der Photorezeptorstrom  $I_{P1}$  einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Die photophobische Reaktion ist direkt mit dem Auftreten des Flagellenstroms und der dabei auftretenden Änderung des Flagellenschlags verbunden (Holland et al., 1997). Die Abbildung 2.4 zeigt die in *C. reinhardtii* während eines Lichtpulses messbaren Ströme.



**Abbildung 2.4. Lichtinduzierte Ströme in *C. reinhardtii*.** **a** Messung bei pH 6.8. **b** Messung bei pH 4. Der Augenfleck war jeweils in die Meßpipette eingesaugt (siehe Grafik).  $I_{P1}$ :  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Photorezeptorstrom.  $I_{P2}$  transienter Protonenstrom.  $I_{SS}$ : stationärer Protonenstrom.  $I_{FF}$ : Flagellenstrom (aus Ehlenbeck et al., 2002).

Die im Augenfleck lokalisierten Photorezeptorströme besitzen ein identisches Rhodopsin-Aktionsspektrum mit einem Maximum bei 494 nm (Ehlenbeck et al., 2002), was im wesentlichen mit den Aktionsspektren der Phototaxis (Maximum bei 503 nm; Foster et al., 1984) und der photophobischen Reaktion (Maximum bei 495 nm; Hegemann et al., 1985) sowie mit dem *in vitro* gemessenen Absorptionsspektrum von Rhodopsin-haltigen aus *Chlamydomonas* gereinigten Membranen (Maximum bei 494 nm; Beckmann & Hegemann, 1991) übereinstimmt. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei den für die Ströme  $I_{P1}$  und  $I_{P2}$  bzw.  $I_{SS}$  verantwortlichen Photorezeptoren um Rhodopsine handelt.

Später wurden das Retinal-bindende Protein *Chlamyopsin 1* (Cop1) und eine alternative Spleißvariante, *Chlamyopsin 2* (Cop2), im Bereich des Augenflecks von *C. reinhardtii* identifiziert (Deininger et al., 1995). Allerdings konnte die Funktion von Chlamyopsin als Photorezeptor für die lichtinduzierten Ströme und die Phototaxis in *Chlamydomonas* nicht bestätigt werden (Fuhrmann et al., 2001).

Schließlich führten Recherchen in der mittlerweile verfügbaren Genomdatenbank von *C. reinhardtii* zur Entdeckung der beiden Gene *Chlamyopsin 3* (Cop3) und *Chlamyopsin 4* (Cop4; Hegemann et al., 2001), die in der Literatur auch *Chlamydomonas sensory rhodopsin A* (CSRA) und *Chlamydomonas sensory rhodopsin B* (CSRB; Sineshchekov et al., 2002) sowie *archaeal-type Chlamydomonas opsin 1* (Acop1) und *archaeal-type Chlamydomonas opsin 2* (Acop2; Suzuki et al., 2003) genannt werden. Beide Proteine weisen starke Homologien zur lichtgetriebenen Protonenpumpe *Bacteriorhodopsin* des halophilen



Archaeobakteriums *Halobacterium salinarum* auf, was vermuten ließ, dass es sich bei Cop3 und Cop4 um Ionentransportproteine handeln könnte, zumal die Aminosäuren des Protonen-leitenden Netzwerks im Vergleich zu *Bacteriorhodopsin* konserviert waren (Kateriya et al., 2004). Diese Vermutung konnte in elektrophysiologischen Experimenten an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*, die nach Injektion von mRNA funktionelles Cop3 bzw. Cop4 exprimierten, bestätigt werden. Cop3-exprimierende Oozyten zeigten eine lichtinduzierbare Protonenleitfähigkeit (Nagel et al., 2002), während die Expression von Cop4 in Oozyten zu einer generellen lichtinduzierbaren Leitfähigkeit von Kationen führte (Nagel et al., 2003). Im Gegensatz zu *Bacteriorhodopsin*, das Protonen gegen ein Konzentrationsgefälle pumpt, handelt es sich bei Cop3 und Cop4 um passive Ionenkanäle, da die Ionen immer entlang eines Konzentrationsgefälles geleitet wurden (Nagel et al., 2002 und 2003). Aufgrund ihrer Funktion als Ionenkanäle wurde Cop3 und Cop4 nunmehr *Channelrhodopsin 1* (ChR1) und *Channelrhodopsin 2* (ChR2) genannt. Im folgenden wird nur noch die neue Nomenklatur verwendet. Beide Ionenkanäle besitzen Rhodopsin-Aktionsspektren, wobei das Maximum von ChR1 bei 500 nm und das von ChR2 bei etwa 460 nm liegt (Nagel et al., 2002, 2003 und 2004).

Die Funktion von ChR1 und ChR2 in *C. reinhardtii* ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Die bisher gewonnenen Daten aus den Saugelektrodenmessungen an *C. reinhardtii* und aus den elektrophysiologischen Messungen an Oocysten deuten darauf hin, dass es sich bei ChR1 um den lichtgesteuerten Protonenkanal für die Stromkomponenten  $I_{P2}$  und  $I_{SS}$  handeln könnte. Außerdem weisen punktuelle Ergebnisse darauf hin, dass ChR1 eine Rolle bei der Phototaxis bei hohen und ChR2 bei niedrigen Lichtintensitäten (Sineshchekov et al., 2002) spielt und ChR1 an der photophobischen Reaktion (Govorunova et al. 2004) beteiligt ist.

## 2.5 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Funktion des Photorezeptorproteins *Channelrhodopsin 1* (ChR1) in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Außerdem sollte in diesem Zusammenhang auch die Expression des verwandten Photorezeptorproteins *Channelrhodopsin 2* untersucht werden. Dazu sollten zunächst spezifische Antiseren gegen ChR1 und ChR2 hergestellt und charakterisiert werden, mit denen die beiden Proteine in Zellextrakten von *C. reinhardtii* nachgewiesen und deren Expression bei verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht werden konnte. Eine wesentliche Aufgabenstellung war die Herstellung von ChR1-Mutanten, bei denen die Expression von ChR1 mittels der RNAi-Technik abgeschaltet werden sollte, um die physiologische Funktion von ChR1 in *C. reinhardtii* aufzuklären. Hierfür sollten die lichtinduzierten Photoströme durch elektrophysiologische Messungen mit der Saugelektrodenteknik, die photophobische Reaktion mittels computergestützter Bildverarbeitung sowie die phototaktische Orientierungsreaktion durch Lichtstreuexperimente in RNAi-Transformanten analysiert werden. Schließlich sollte ChR1 und ChR2 in einer Immunfluoreszenzanalyse *in situ* in der *C. reinhardtii*-Zelle lokalisiert werden. Aus den erzielten Ergebnissen sollte die Funktion von *Channelrhodopsin 1* in *C. reinhardtii* abgeleitet werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung polyklonaler anti-ChR-Antikörper

Eine entscheidende Voraussetzung für die vergleichende Analyse der Expression der ChR1- und ChR2-Proteine in *C. reinhardtii* und Identifikation von Mutanten mit reduzierter Menge an ChR1-Protein nach RNAi-Behandlung sowie für die Lokalisation der beiden Proteine *in situ*, war die Verfügbarkeit möglichst monospezifischer Antiseren gegen beide Proteine. Spezifische Antikörper ermöglichen es, Proteine in Zellextrakten immunologisch nachzuweisen und deren Expression unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Da zu Beginn dieser Arbeit noch keine spezifischen Antikörper gegen *Channelrhodopsin 1* und *Channelrhodopsin 2* zur Verfügung standen, wurden deshalb zunächst polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen ChR1 und ChR2 hergestellt. Die Generierung und Charakterisierung solcher Antiseren war ein erstes wesentliches Ziel dieser Arbeit.

##### 3.1.1 Heterologe Expression von ChR1- und ChR2-Antigenen in *E. coli*

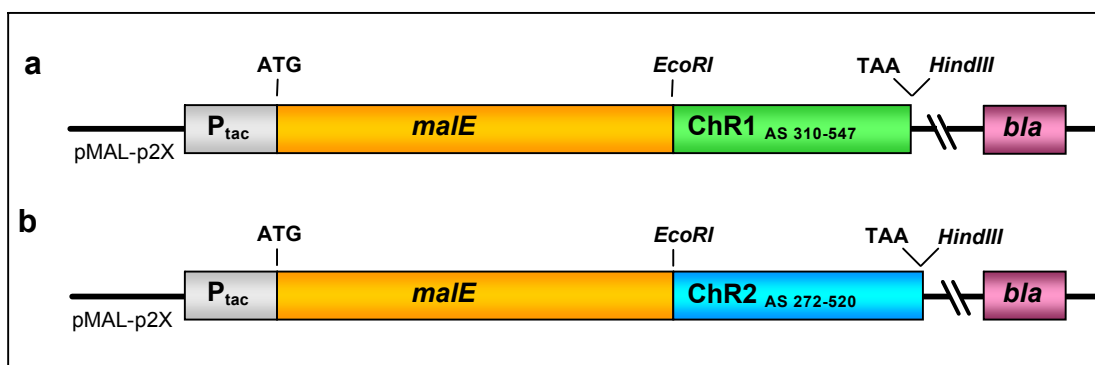
Da Versuche fehlschlagen, den hydrophoben Bereich der transmembranen Domäne von ChR1 und ChR2 in *E. coli* zu exprimieren (Kateriya, 2004), wurde für die Expression der Antigene der hydrophilere Bereich nach der Transmembranregion gewählt. Um die Löslichkeit der Proteinfragmente von vornherein zu erhöhen, wurden die Antigene als Fusion mit dem gut löslichen Maltosebindprotein (MBP) von *E. coli* exprimiert. Dies ermöglichte gleichzeitig eine Affinitätsreinigung der MBP-Fusionsproteine über eine Amylose-Säule, da MBP eine hohe Affinität zu Amylose besitzt. Für das ChR1-Antigen wurde der Bereich von Aminosäure 310 bis 547 und für das ChR2-Antigen der Bereich von Aminosäure 272 bis 520 verwendet, wobei die beiden *Channelrhodopsine* neben der transmembranen Region auch in diesen Bereichen auf Aminosäureebene starke Homologie aufweisen (Abbildung 3.1).

ChR1	MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLEN	60
ChR2	-----MDYGGALSAVG-----RELFVTNPVVVN	24
	* * *	** *
ChR1	NGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCGW	120
ChR2	-GSVLVPED--QCYCAGWIESRGNTASNVLQWLAAGFSILLMFYAYQTKWSTCGW	81
	*** * * * * *	*****
ChR1	EEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTVWLRVYAEWLLTCPVILIHLSNLTGL	180
ChR2	EEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPMSMLYLATGHRVQWLRVYAEWLLTCPVILIHLSNLTGL	141
	***** * * * * *	*****
ChR1	ANDYNKRTMGLLVSDIGTIVWGTAAALSKGYVRVIFFLMGLCYGIYTFFNAAKVYIEAYH	240
ChR2	SNDSYRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFLGLCYGANTFFHAAKAYIEGYH	201
	*** ***** *	*****
ChR1	TVPKGICRDLVRYLAWLYFCSWAMFPVLFLLGPEGFGHINQFNSAIAHAAILDLASKNAWS	300
ChR2	TVPKGRCRQVVTGMALFFVSWGMPFILFLGPEGFALLSVYGSTVGHITIDLSKNCWG	261
	***** * * * * *	* * * * *
ChR1	MMGHFLRVKHEHILLYGDIRKKQKVNVAQEMEVETMVHEEDE--TQKVPTAKYANRDS	359
ChR2	LLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGAVNKGTKYASRES	321
	* * * * * *	* * * * *
ChR1	FIIMRDLKEKGFETRASLDGDPNGDAEANAAGGKPGMEMGKMTGMGMSMG--AGMG--	415
ChR2	FLVMRDKMKEKGIDVRASLDN--SKEVEQEQAARAAMMMNGMGMGMGMGMGMGMGMGM	379
	* * * * * *	* * * * *
ChR1	--MAN-----IDSGRVILAVPDISMVDFFREQFARLPVPYELVPALGAENTLQL	462
ChR2	NGMAGGAKPGLELTPQLQPRVILAVPDISMVDFFREQFQLSVTYELVPALGADNTLAL	439
	* * * * * *	* * * * * *
ChR1	VQQAQSLGGCDFVLMHPEFLRDRSPTGLLPRLKMGQRAAAFGWAAIGPMRDLEIEGSGVD	522
ChR2	VTQAQNLGGVDFVLIHPEFLRDRSSTSILSRLRGAGQVAAFQWAGLQPMRDLESANLD	499
	* * * * * *	* * * * * *
ChR1	GWLEGPSFGAGINQOALVALINRMQQAKKMGMMG-----GMGMGMGGMG-MGMG	571
ChR2	GWLEGPSFGQGIPLAHIVALVAKMQMRKMQQMQQIGMMTGMMNGMGGMGGMGMGMGMG	559
	***** * * * * *	* * * * *
ChR1	MGMG-MAPSMNAGMTGGMGG--ASMGG----AVMGMGMGMQPMQAMP--AMSPMTQ	620
ChR2	NGMNMNGMGGGM	619
	* * * * * *	* * * * *
ChR1	QPS-MMSQPSAMSAGGAMQAMGGVMPSPAP----GGRVGTNPLFGSAPSPSSQPGISPG	675
ChR2	MSSGVVANVTPSAAGGMGMMNGMAAPQSPGMNGGRLGTNPLFNAAPSPSSQLGAEAG	679
	* * * * * *	* * * * *
ChR1	MATPP-----AATAAPAAGGSEAEMLQQLMSEINRLKNEELGE	712
ChR2	MGSMGGMGGMGGMGGMGGMGGMGGAATTQAAGGNAEAEMLQNLMEINRLKRELGE	737
	* * * * * *	* * * * *

**Abbildung 3.1. Vergleich der Aminosäuresequenz von ChR1 und ChR2.** Der Sequenzbereich des ChR1-Antigens ist grün, der des ChR2-Antigens blau dargestellt. Die identischen Aminosäuren sind mit einem Stern markiert. Die Transmembrandomänen sind grau hinterlegt (nach Nagel et al., 2005). Für das Alignment wurde das Programm Clustal X (1.83) verwendet.

Für die Expression wurde das pMAL-Expressionssystem (siehe Kapitel 5.5.7.1) verwendet, das es erlaubt, MBP-Fusionsproteine durch die Affinität von MBP zu Amylose, über eine Amylose-Säule unter nativen Bedingungen aufzureinigen. Die Nukleotidsequenzen der Antigene wurden mittels PCR ausgehend von cDNA der aus dem Kazusa EST-Projekt (Kazusa DNA Research Institute, Japan; <http://www.dna-res.kazusa.or.jp>) stammenden EST-Klone AV641459 (ChR1) und AV643095 (ChR2)

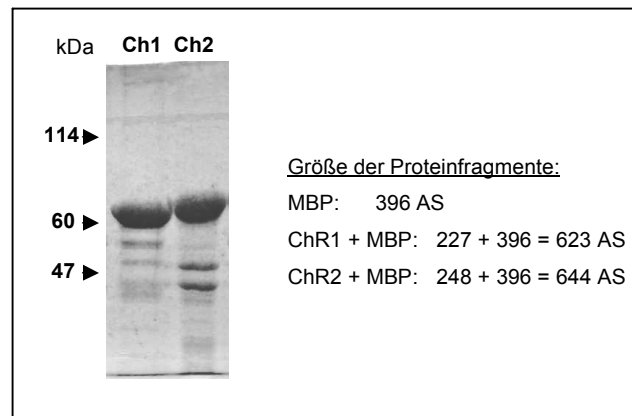
mit den Oligonukleotiden ChR1/1f (aatgaattcaagatccacgagcacatcc) und ChR1/1r (ctgcatgcggttgatcagctaaagctttac) bzw. ChR2/1f (aatgaattccacgagcatatcctcatcc) und ChR2/1r (caccagggcaacgatgtgtaaagctttac) mittels PCR amplifiziert, wobei die Oligonukleotide die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII* und die reversen Oligonukleotide ChR1/1r und ChR2/1r zusätzlich die zum Stop-Codon komplementäre Sequenz TAA (fett-gedruckt) enthielten. Die PCR-Produkte wurden über die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* in den pMAL-p2x-Expressionsvektor (Fa. New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) kloniert (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2. Konstrukte zur Expression der beiden ChR-Antigene.** a ChR1. b ChR2. Die Klonierung erfolgte in den Vektor pMAL-p2x (New England Biolabs). Die exprimierten Aminosäurebereiche von ChR1 (grün) und ChR2 (blau) sowie Start- (ATG), Stop-Codon (TAA) und wichtige Restriktionsschnittstellen sind jeweils angegeben. P<sub>tac</sub>: induzierbarer Promotor, *malE*: Maltose-Bindeprotein von *E. coli* (gelb), *bla*: Ampicillin-Resistenzgen (violett).

Für die Expression wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) verwendet. Da die Größe des MBP etwa 40 kDa (396 Aminosäuren) beträgt, ergab sich für die ChR1-Fusion ein zu erwartendes Molekulargewicht von etwa 69 kDa und für die ChR2-Fusion ein Molekulargewicht von etwa 71 kDa. Während ChR1 als lösliches Protein exprimiert und nativ über eine Amylose-Säule aus Zellextrakten von *E. coli* gereinigt werden konnte, lag das ChR2-MBP-Fusionsprotein nach der Expression in *E. coli* unlöslich in sphärischen Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) vor, so dass eine Reinigung über eine Amylose-Säule nicht durchgeführt werden konnte. Die vor allem bei der Expression von Fremdprotein gebildeten *inclusion bodies* bestehen in der Regel zu 80 – 95 % aus vollständig synthetisierten Fremdprotein, das jedoch in einem nur partiell gefalteten Zustand vorliegt, und enthalten nur noch geringe Mengen an anderen zelleigenen Proteinen. (Baneyx & Mujacic, 2004). *Inclusion bodies* besitzen

eine höhere Dichte als die übrigen Zellkomponenten und können daher sehr leicht aus Zelllysaten mittels Zentrifugation von den übrigen Zellkomponenten abgetrennt und schließlich durch die denaturierende Wirkung von 8 M Harnstoff aufgelöst werden. Dadurch kann das exprimierte Fremdprotein in relativ reiner Form gewonnen werden. Auf diese Weise konnte das ChR2-MBP-Fusionsprotein direkt aus den *inclusion bodies* gereinigt werden (siehe Kapitel 5.5.7.2) und stand somit in denaturierter Form zur Verfügung. Wie die SDS-Gelanalyse in Abbildung 3.3 zeigt, enthielten die aufgereinigten Proteinlösungen noch geringe Mengen an kontaminierenden Proteinen.



**Abbildung 3.3. Gereinigte ChR1- und ChR2-MBP-Fusionsproteine.** Die Proteinfragmente (etwa 10 µg) wurden auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und mit Comassie-Farbstoff angefärbt. Ch1: ChR1-Antigen. Ch2: ChR2 Antigen. MBP: Maltose-Bindeprotein. Die Größe der einzelnen Proteinfragmente in kDa ist angegeben.

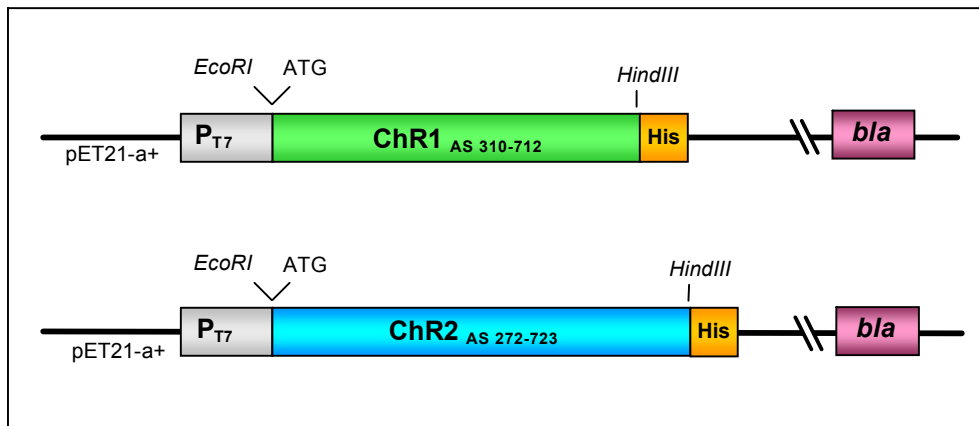
Insgesamt konnten aus 800 ml 2x YT-Kultur jeweils etwa 5 mg Protein gewonnen werden. Die Konzentration der Proteinlösungen wurde jeweils auf 1 mg/ml eingestellt. Die Immunisierung von Kaninchen mit den gereinigten ChR1- und ChR2-Proteinlösungen wurde von der Firma Davids Biotechnologie (Regensburg) durchgeführt.

### 3.1.2 Affinitätsreinigung der polyklonalen Rohseren

Nach der Immunisierung enthalten polyklonale Antiseren neben spezifischen Antikörpern, die das Antigen binden, auch alle anderen Antikörper des immunisierten Organismus. Diese Antikörper können ebenfalls in Westernblot-Analysen mit Proteinen von *C. reinhardtii* zu starken Kreuzreaktionen führen. Deshalb wurden die spezifischen ChR1- und ChR2-Antikörper aus den erhaltenen Rohseren mittels einer Affinitätsreinigung im Batch-Verfahren aufgereinigt. Bei dieser Methode werden die spezifischen Antikörper durch reversible Bindung an ein auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiertes Antigen aus dem Rohserum gewonnen (siehe Kapitel 5.6.2).

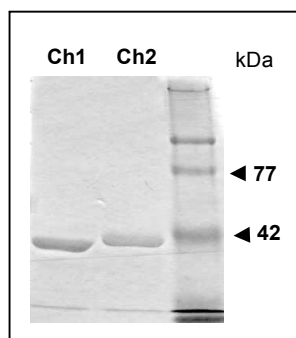
#### 3.1.2.1 Heterologe Expression von ChR1-/ChR2-Proteinfragmenten

Da die Immunisierung der Kaninchen mit MBP-Fusionsproteinen erfolgte, konnten diese nicht für die Affinitätsreinigung verwendet werden, weil hierbei neben den anti-ChR-Antikörpern auch die während der Immunisierung vom Kaninchen gebildeten anti-MBP-Antikörper gereinigt würden, welche in Westernblot-Analysen unter Umständen zu starken Kreuzreaktionen mit Proteinen von *C. reinhardtii* führen könnten. Für die Affinitätsreinigung wurden deshalb ChR1- und ChR2-Proteinfragmente verwendet, die über einen C-terminalen His-tag verfügten und über eine Ni-NTA-Agarose-Säule gereinigt werden konnten. Die in Abbildung 3.4 gezeigten Expressionskonstrukte lagen jeweils im Vektor pET21-a+ (Novagen) kloniert vor und wurden freundlicherweise von Dr. Suneel Kateriya zur Verfügung gestellt. Mit ihnen konnte der ChR1-Bereich von Aminosäure 310 bis 712 (ChR1<sub>As310-712</sub>) und der ChR2-Bereich von Aminosäure 272 bis 723 (ChR2<sub>As272-723</sub>) exprimiert und über den C-terminalen His-tag mittels einer Ni-NTA-Säule gereinigt werden. Diese Proteinfragmente enthalten jeweils die Bereiche der Antigene, mit denen auch die anti-ChR1- und anti-ChR2-Antikörper hergestellt wurden.



**Abbildung 3.4. Konstrukte zur Expression von ChR1- und ChR2 Proteinfragmenten mit C-terminalem His-tag.** Die exprimierten Aminosäurebereiche von ChR1 (grün) und ChR2 (blau) sowie wichtige Restriktionsschnittstellen und das ATG-Start-Codon sind jeweils angegeben. P<sub>T7</sub>: T7 Promotor (grau). His: 6 Histidin-Reste (orange). bla: Ampicillin-Resistenzgen (violett). Die Konstrukte wurden von Dr. Suneel Kateryia zur Verfügung gestellt.

Die Expression und Reinigung der His-ChR1/ChR2-Proteinfragmente erfolgte über Ni-NTA-Agarose nach Standardbedingungen gemäß der Vorschrift des *Expressionist-Handbuches* von QIAGEN (siehe Kapitel 5.5.7.3), wobei im Elutionspuffer die Harnstoffkonzentration auf 2 M reduziert wurde, um die Proteinkonzentration anschließend direkt mittels eines BCA-Tests bestimmen zu können. Abbildung 3.12 zeigt das Ergebnis der Reinigung nach Aufkonzentrierung mit Hilfe einer Amicon-Zelle und einer Membran mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa.



**Abbildung 3.5. ChR1- und ChR2-Protein-fragmente nach Reinigung über den C-terminalen His-tag.**

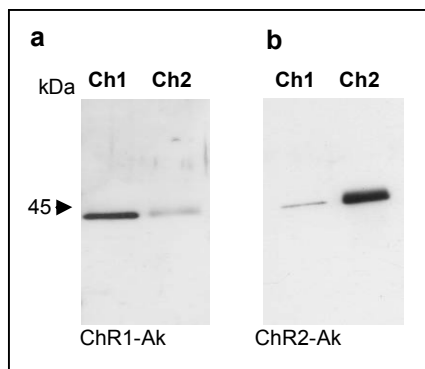
Die Proteinfragmente (etwa 5 µg) wurden in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und mit Comassie-Farbstoff angefärbt. Ch1: ChR1-Fragment (402 Aminosäuren). Ch2: ChR2-Fragment (448 Aminosäuren).



Insgesamt konnten aus 800 ml einer *E. coli* Kultur in 2x YT-Medium 2,3 mg ChR1-Protein und 4,8 mg ChR2-Protein gewonnen werden. Für die Affinitätsreinigung wurden je 200 µg des gereinigten ChR1- bzw. ChR2-Proteinfragments eingesetzt.

### 3.1.2.2 Test der gereinigten anti-ChR-Antikörper auf Kreuzreaktion

Da die beiden Channelrhodopsine sehr starke Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz aufweisen (Abbildung 3.1), wurde die Spezifität der gereinigten Antikörper für das jeweils andere Antigen getestet. Dazu wurde eine Westernblot-Analyse mit je 100 ng der gereinigten ChR1<sub>AS310-712</sub>- und ChR2<sub>AS272-723</sub>-Proteinfragmente (siehe 3.1.2.1) und den affinitätsgereinigten Antikörpern durchgeführt (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6. Kreuzreaktions-Test der gereinigten ChR-Antikörper.**

**a** ChR1-Antikörper (1:5000). **b** ChR2 Antikörper (1:3000). **Ch1** ChR1<sub>AS310-712</sub>-Proteinfragment, **Ch2** ChR2<sub>AS272-723</sub>-Proteinfragment. Pro Spur wurden 100 ng Protein geladen.

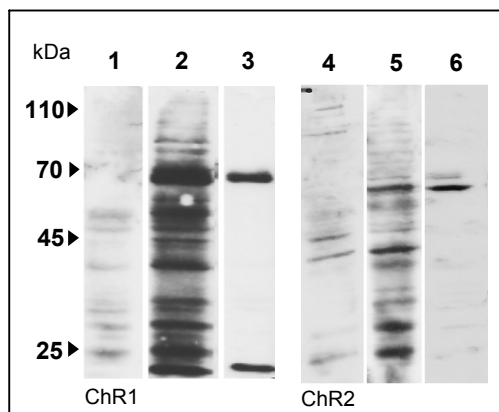
Hierbei zeigte sich, dass die beiden gereinigten Antiseren auch schwache Kreuzreaktionen mit dem jeweils anderen Antigen lieferten. Nach der densitometrischen Auswertung der Signale aus Abbildung 3.6 mit dem Programm Optiquant zeigte sich, dass die Affinität des anti-ChR1-Antikörpers für sein eigenes Antigen etwa fünfmal stärker war als für ChR2 und der anti-ChR2-Antikörper sein eigenes Antigen etwa zehnmal besser erkannte als das ChR1-Antigen (Tabelle 3.1). Diese Kreuzreaktion musste bei der Interpretation von Westernblot-Analysen mit Zellextrakten von *C. reinhardtii* und bei Immunlokalisationen berücksichtigt werden.

Antikörper	Antigen	Brutto DLU x 10 <sup>7</sup>	Hintergrund x 10 <sup>7</sup>	Netto DLU x 10 <sup>7</sup>	Signalstärke (%)
ChR1-Ak	ChR1	5,0	2,6	2,4	100
	ChR2	2,0	2,6	0,4	17
ChR2-Ak	ChR1	1,8	1,5	0,3	8
	ChR2	5,4	1,5	3,9	100

**Tabelle 3.1. Densitometrische Auswertung der ChR1- und ChR2-Kreuzreaktion.** Die DLU-Werte (Digital Light Unit) entsprechen der Intensität der Signale und wurden mit dem Programm Optiquant (Fa. Packard Instruments) ermittelt. Das Signal des jeweiligen Antikörpers mit seinem eigenen Antigen wurde auf 100 % gesetzt.

### 3.2 Test der gereinigten anti-ChR-Antikörper mit Zellextrakten von *C. reinhardtii*

Nach der Aufreinigung konnte eine Steigerung der Spezifität des ChR1- und ChR2-Antiserums erreicht werden (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7. Test der gereinigten Antikörper mit *C. reinhardtii*-Zellextrakten**

1 ChR1-Prä-Immunsereum 1:1000, 2 ChR1-Rohserum 1:1000, 3 gereinigter ChR1-Antikörper 1:5000, 4 ChR2-Prä-Immunsereum 1:1000, 5 ChR2-Rohserum 1:1000, 6 gereinigter ChR2-Antikörper 1:3.000)

Während das ChR1-Rohserum (Spur 2) sehr starke Kreuzreaktionen in einem Bereich von 25 bis 100 kDa aufwies, lieferte das gereinigte ChR1-Antiserum (Spur 3) nur zwei prominente Banden bei etwa 70 und 20 kDa, wobei das Signal bei 70 kDa in etwa der rechnerischen Größe von *Channelrhodopsin 1* (712 As) entsprach. Im Falle der 20 kDa-Bande konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um ein ChR1-spezifisches Signal handelte, da Westernblot-Analysen mit einer ChR1-Mutante des zellwandlosen Stammes *cw15arg<sup>-</sup>A*, bei der das ChR1-Gen durch einen

*Knockout* zerstört worden war, weiterhin das Signal bei 20 kDa zeigten (Boris Zorin, persönliche Mitteilung; siehe Kapitel 4.1). Da dieser Stamm von Natur aus immotil ist und ungünstige elektrische Eigenschaften besitzt (Sabine Ehlenbeck, persönliche Mitteilung), konnten an dieser Mutante die in Kapitel 3.7 beschriebenen Saugelektrodenmessungen nicht durchgeführt werden. Auch das ChR2-Rohserum lieferte mehrere Kreuzreaktionen (Spur 5), wohingegen das gereinigte ChR2-Antiserum (Spur 6) ein starkes und ein schwaches Signal zwischen 60 und 70 kDa zeigte. Die Größe dieser Banden entsprach nicht exakt dem rechnerischen Molekulargewicht von *Channelrhodopsin 2* (723 As), das bei etwa 80 kDa liegen sollte. Der Größenunterschied kann womöglich aus einer Modifikation des ChR2-Proteins resultieren, die das Laufverhalten im SDS-Gel beeinflusst. Der Test mit den Prä-Immunsereen (Spuren 1 und 4) zeigt in beiden Fällen nur schwache Kreuzreaktionen mit *C. reinhardtii*-eigenen Proteinen, so dass die erhaltenen Signale als spezifische angesehen werden können.

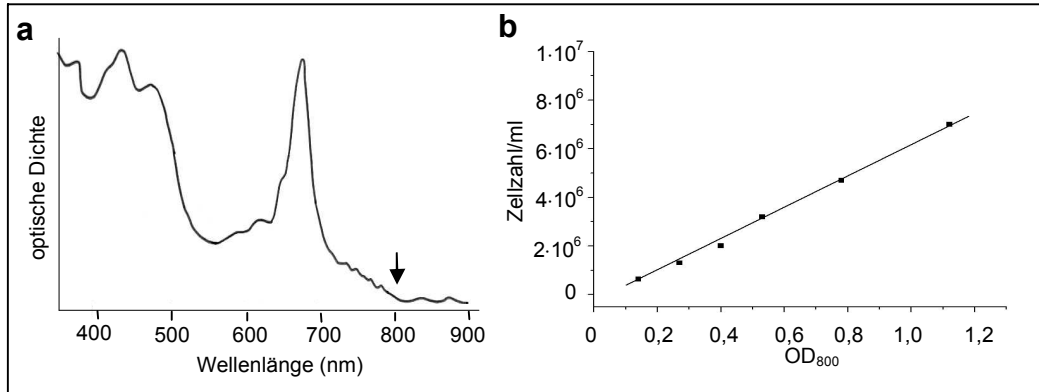
Somit standen für die weiteren Arbeiten spezifische und gut charakterisierte Antiseren gegen die beiden Proteine *Channelrhodopsin 1* und *2* zur Verfügung.

### **3.3 Expression von *Channelrhodopsin 1* in *C. reinhardtii***

#### **3.3.1 Standardisierung der Bedingungen für Westernblot-Analysen.**

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war, RNAi-Mutanten mit möglichst starker Reduktion des ChR1-Proteins zu identifizieren, wofür eine große Anzahl transgener Zelllinien in Westernblot-Analysen untersucht werden musste. Da hierfür quantitative Vergleiche des ChR1-Gehaltes der untersuchten Zelllinien notwendig waren, kam der Standardisierung des Proteinauftrages bei den Westernblot-Analysen eine besondere Bedeutung zu. Aufgrund der Tatsache, dass alle transgenen Zelllinien unter den gleichen Kulturbedingungen angezogen wurden, bot sich eine Standardisierung der verwendeten Proteinextrakte hinsichtlich identischer Zellzahlen an. Da das Auszählen vieler Kulturen sehr zeitaufwendig gewesen wäre, wurde die Zellzahl photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 800 nm bestimmt. Da bei dieser Wellenlänge keine Absorption der Pigmentsysteme von *C. reinhardtii* mehr stattfindet (Abbildung 3.8 a), und zwischen optischer Dichte und der Zellzahl

ein positiver linearer Zusammenhang besteht (Abbildung 3.8 b), konnte die photometrische Messung als Maß für die Zellzahl eingesetzt werden.



**Abbildung 3.8. Photometrische Bestimmung der Zellzahl.** **a** Absorptionsspektrum einer *C. reinhardtii*-Kultur in HSA-Medium. Die Messung erfolgte mit dem Photometer Ultrospec II (Amersham Bioscience, New York). Der Pfeil markiert die Absorption bei 800 nm. **b** Linearer Zusammenhang zwischen optischer Dichte bei 800nm und der Zellzahl.

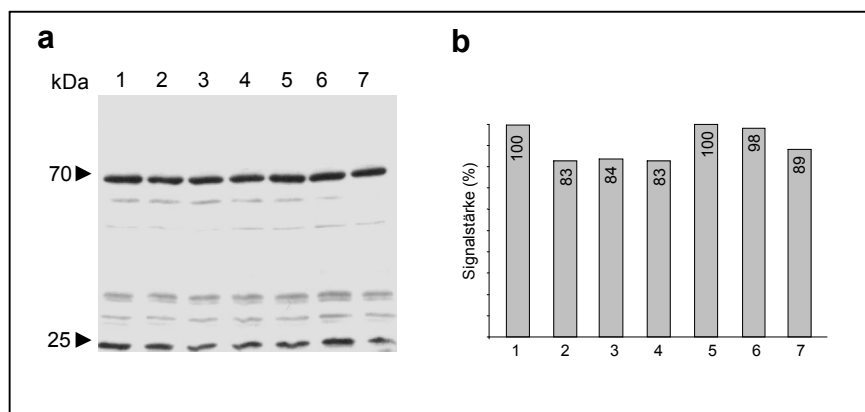
Für die Westernblot-Analysen wurden hitzedenaturierte Zellextrakte mit standardisierter Zellzahl verwendet, wobei das für die Herstellung des Zellextraktes notwendige Kulturvolumen ( $V_{\text{Kultur}}$ ) nach folgender Formel berechnet wurde:

$$V_{\text{Kultur}} \text{ (ml)} = 0,15 \cdot 10 / OD_{800} = 1,5 / OD_{800}$$

Die in diesem Kulturvolumen enthaltenen Zellen wurden geerntet, in 150 µl Probenpuffer resuspendiert und für 3 min auf 95 °C erhitzt. Für den Nachweis von ChR1 wurden jeweils 10 µl des Zellextraktes ( $6 \cdot 10^5$  Zellen) und der anti-ChR1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. ChR2 wurde mit 20 µl des Zellextraktes ( $1,2 \cdot 10^6$  Zellen) und einer Verdünnung des anti-ChR2-Antikörpers von 1:3000 detektiert.

### 3.3.2 Ermittlung der experimentell bedingten Streuung der Signalstärke der ChR1-Bande

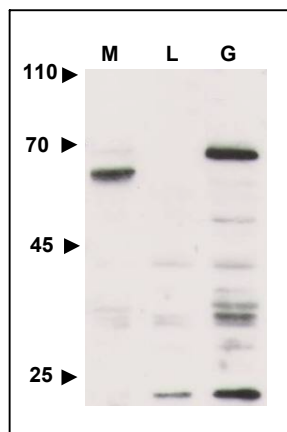
Um eine eventuelle Veränderung in der ChR1-Expression von experimentellen Artefakten unterscheiden zu können, war es notwendig, die experimentell bedingte Streuung der ChR1-Signale zu ermitteln. Dazu wurde eine Westernblot-Analyse mit hitzedenaturierten Zellextrakten von sieben unterschiedlichen asynchronen Dauerlicht-Kulturen der Zellwandmutante *cw2* unter Standardbedingungen (siehe 3.3.1) durchgeführt. Die densitometrische Quantifizierung mit Optiquant ergab eine Streuung der Signalstärke von maximal 17 % (Abbildung 3.9). Diese Abweichung kann durch zwei Effekte verursacht worden sein. Zum einen enthalten asynchrone Kulturen von *C. reinhardtii* unterschiedliche Mengen an sich teilenden Zellen im Zwei-, Vier- und Acht-Zellstadium, die durch ihre unterschiedliche Größe und Form die Messung der optischen Dichte bei 800 nm beeinflussen, zum anderen stören Verunreinigungen des Kulturmediums, z. B. durch ausgefallene Salze, die photometrische Messung. Demzufolge waren bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Westernblot-Analysen mit dem anti-ChR1-Antikörper nur Signalschwankungen von deutlich mehr als 20 % als signifikante Änderungen in der Expression anzusehen.



**Abbildung 3.9. Experimentell bedingte Streuung der Intensität von ChR1-Signalen im Immunoblot.** **a** Immunoblot mit sieben Hitzeextrakten von unterschiedlichen Dauerlichtkulturen vegetativer *cw2*-Zellen in HSA-Medium mit Sorbitol. **b** Diagramm der Intensitäten der ChR1-Signale, relativ zur Spur 1, die willkürlich auf 100% gesetzt wurde.

### 3.3.3 ChR1 ist in der Zellmembran lokalisiert.

*Channelrhodopsin 1* enthält innerhalb der ersten 300 Aminosäuren sieben hypothetische Transmembrandomänen (Nagel et al. 2002) und sollte daher in der Zellmembran von *C. reinhardtii* lokalisiert sein. Membranproteine sind im allgemeinen unlöslich in polaren Lösungsmitteln wie Wasser, da sie viele hydrophobe Aminosäuren enthalten. Deshalb kann man die in der Membran lokalisierten Proteine durch Ultra-Zentrifugation präzipitieren und damit von den löslichen Proteinen trennen. Um dies zu überprüfen, wurde ein Zellextrakt in eine lösliche und eine nicht-lösliche Fraktion (Membranfraktion) durch einstündige Zentrifugation bei 100.000 g (siehe Kapitel 5.5.9) getrennt und in einer Westernblot-Analyse untersucht (Abbildung 3.10).

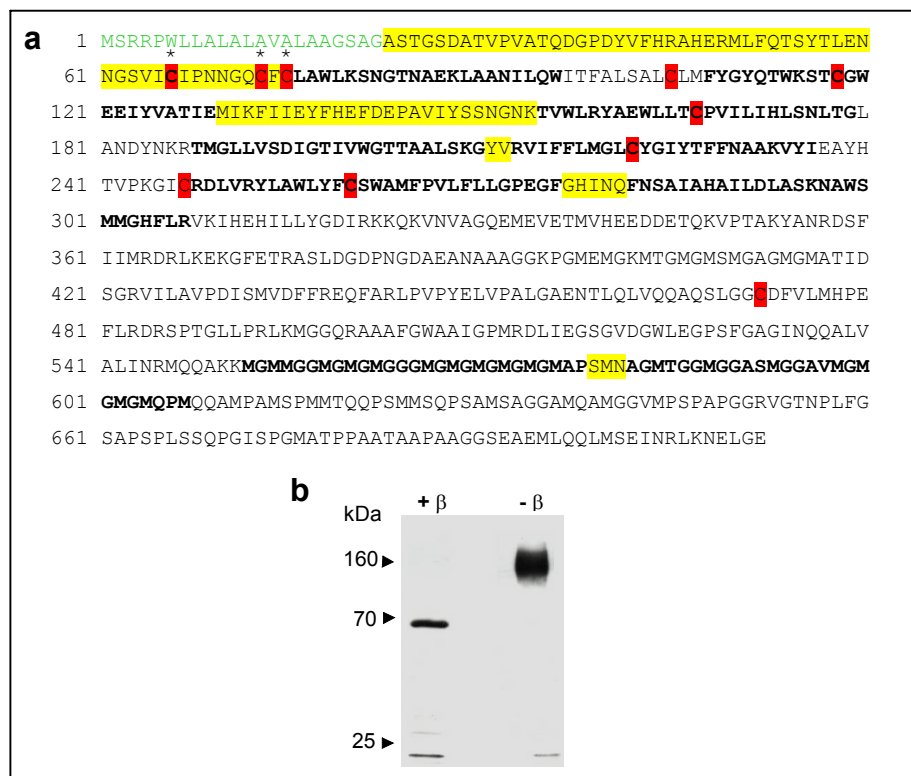


**Abbildung 3.10. Lokalisation von ChR1 in der Membranfraktion.** Westernblot-Analyse mit einer Membranfraktion (M), löslichen Fraktion (L) und einem Gesamt-Zellextrakt (G) der Zellwandmutante *cw2* mit dem anti-ChR1-Antikörper. Die Spuren M und L enthalten keine standardisierten Protein-Mengen.

Während der Gesamtzellextrakt in dieser Analyse die bekannten Banden bei 70 kDa und 20 kDa lieferte, konnte in der Membranfraktion interessanterweise nur eine Bande bei etwa 65 kDa detektiert werden und in der löslichen Fraktion ausschließlich eine Bande bei 20 kDa. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der 65-kDa Bande der Membranfraktion um das ChR1-Protein handelt. Diese hatte aber während der etwa zweistündigen Präparationsphase von der Ernte der Zellen bis zum Aufkochen des Hitzeextraktes in Probenpuffer offensichtlich an Größe verloren, was evtl. durch eine spezifische oder unspezifische Protease-Einwirkung trotz Verwendung von Protease-Inhibitoren (siehe Kapitel 5.5.9) zu erklären ist.

### 3.3.4 Disulfidbindungen beeinflussen die Konformation von ChR1

Die Sulfhydryl-Gruppen von Cysteinen können intra- und intermolekulare Disulfidbindungen (S-S-Bindung) eingehen. Dies kann zur Stabilisierung der Struktur der Polypeptidkette oder zur Interaktion mit anderen Proteinen führen. Disulfidbindungen können *in vivo* nur außerhalb des reduzierenden Milieus des Zytosols gebildet werden. *Channelrhodopsin 1* besitzt insgesamt zehn Cysteine, von denen neun innerhalb der sieben hypothetischen Transmembran-Helices und ein weiteres intrazellulär bei Position 472 lokalisiert sind (Abbildung 3.11 a). Bei der Herstellung der Hitzeextrakte für die Westernblot-Analysen wurden die Disulfidbindungen durch die reduzierende Wirkung des Alkohols  $\beta$ -Mercaptoethanol im Probenpuffer zerstört.



**Abbildung 3.11. Disulfidbrücken beeinflussen die Konformation von ChR1.**  
**a** Aminosäuresequenz von ChR1. Cysteinreste sind rot, das 22 bp lange Signalpeptid ist grün, und die Transmembranregionen sind fett dargestellt (nach Nagel et al., 2005). Die extrazellulären Proteinbereiche sind gelb hinterlegt, und die extrazellulären Cysteinreste mit einem Stern markiert. **b** Immunoblot mit Hitzeextrakten von vegetativen Zellen der Zellwandmutante *cw2*, die mit (+  $\beta$ ) und ohne (-  $\beta$ )  $\beta$ -Mercaptoethanol hergestellt worden sind.

Die Cysteine an Position 66, 73 und 75 liegen auf der extrazellulären Seite der Zellmembran und kommen somit prinzipiell für Disulfidbindungen in Frage. Dieser Sachverhalt wurde experimentell durch vergleichende Westernblot-Analysen in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von  $\beta$ -Mercaptoethanol überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.11 b dargestellt.

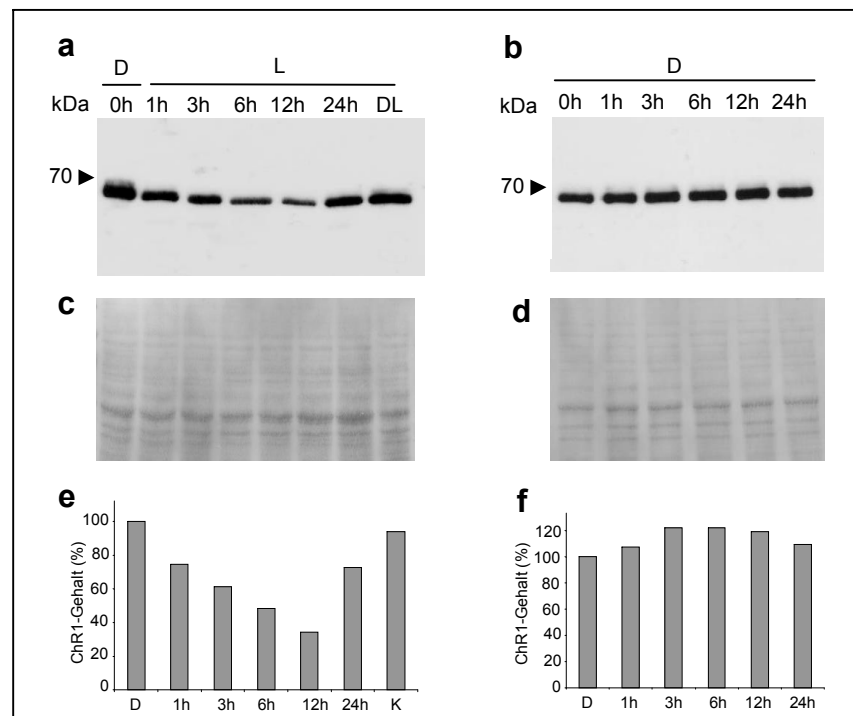
Nicht reduziertes ChR1 ergab unter diesen Bedingungen eine breite Bande bei etwa 160 kDa. Dies entsprach ungefähr der doppelten Größe des ChR1-Signals nach Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol. *Channelrhodopsin 1* besitzt demnach mindestens eine *in vivo* ausgebildete Disulfidbindung. Der starke Größenunterschied zwischen reduziertem und nicht-reduziertem ChR1 deutet sehr stark auf eine intermolekulare Disulfidbindung mit einem weiteren ChR1-Protein (Homodimer) oder aber einem noch unbekannte Protein von *C. reinhardtii* (Heterodimer) hin.

### **3.3.5 ChR1-Expression in *C. reinhardtii* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen**

Im Rahmen der geplanten Funktionsaufklärung von ChR1 sollten Westernblot-Analysen transgener Zelllinien, in denen die ChR1-Expression durch die RNAi-Methodik ausgeschaltet werden sollte, eine zentrale Rolle spielen. Da es sich bei ChR1 um ein lichtgesteuertes Kanalprotein handelt (Nagel et al., 2002), war es, auch als notwendige Basis für die weiteren Untersuchungen, von wesentlichem Interesse, seine Expression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden sowohl vegetative Zellen als auch Gameten der Zellwandmutante *cw2* und des Wildtypstammes *CC-124mf* verwendet. Deshalb wurde in diesen Stämmen die Expression von ChR1 in vegetativen Zellen unter Dauerlicht- und Dauerdunkelbedingungen sowie in Gameten im Dauerlicht untersucht. Vegetative Zellen wurden dabei in HSA-Medium kultiviert. Die Gametenbildung fand für 24 Stunden in stickstofffreiem NMM-Medium statt. Wie aus Abbildung 3.12 hervorgeht, zeigten beide Stämme unter allen Bedingungen ein nahezu identisches Expressionsmuster. ChR1 wurde in asynchronen Kulturen von *cw2* (Abbildung 3.12 a) und *CC-124mf* (Abbildung 3.12 b) unabhängig vom Licht exprimiert (Spuren L und D). Auch die Gameten der entsprechenden Stämme enthielten eine nahezu unveränderte Menge von ChR1 (Spur Gam).







**Abbildung 3.13. Licht-induzierter Rückgang der ChR1-Expression nach Dunkel-Licht-Wechsel.** **a** Dunkel-Licht-Übergang. D: Dunkelheit. L: Dauerlicht (70W/m<sup>2</sup>). **b** Dunkelkontrolle. **c** – **d** Ponceau-S-Färbungen der Nitrocellulose-Membran vor der Detektion zur Kontrolle der Proteinmenge. **e** – **f** Diagramme des ChR1-Gehalts der einzelnen Spuren aus **a** und **b**. Die Signalstärke, als Maß für den ChR1-Gehalt, wurde mit dem Programm Optiquant densitometrisch bestimmt. Der Anfangswert bei 0 h wurde auf 100 Prozent gesetzt.

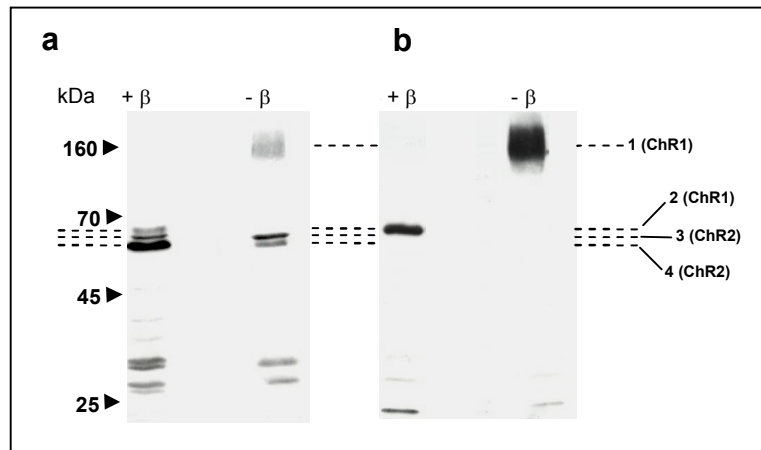
In einem parallel durchgeführten Kontrollexperiment, bei dem die Zellen während der gesamten Dauer des Experiments im Dunkeln gehalten wurden, konnte keine signifikante Änderung der ChR1-Menge innerhalb von 24 Stunden festgestellt werden (Abbildung 3.13 b). Die Ponceau-S-Färbungen der Nitrocellulose-Membranen, die vor der Detektion mit dem anti-ChR1-Antikörper erfolgten, zeigten, dass die einzelnen Spuren jeweils äquivalente Proteinmengen enthielten (Abbildung 3.13 c und d). Damit konnte gezeigt werden, dass die Expression von ChR1 durch einen Dunkel-Licht-Wechsel beeinflusst wird. Die Relevanz dieses Ergebnisses wird unter 4.2 diskutiert.

### **3.4 Expression von *Channelrhodopsin 2* in *C. reinhardtii***

Die Analyse der Expression von *Channelrhodopsin 2* war im Rahmen dieser Arbeit wichtig, da es sich hierbei um einen weiteren lichtgesteuerten Ionenkanal handelt (Nagel et al., 2003). Vor allem in Hinblick auf die Analyse der Funktion von ChR1 in RNAi-Transformanten war die Kenntnis der Expression von ChR2 in solchen Transformanten von großer Bedeutung, da für ChR2 eine Beteiligung an lichtinduzierten Bewegungsreaktionen in *C. reinhardtii* postuliert wurde (Sineshchekov et al., 2002; Govorunova et al., 2003). Im folgenden werden die dabei erhaltenen Ergebnisse beschrieben.

#### **3.4.1 Der anti-ChR2-Antikörper erkennt zwei Banden bei etwa 60 kDa**

Da der ChR2-Antikörper auch mit dem ChR1-Antigen kreuzreagierte (siehe 3.1.2.2), und zwei Banden im Bereich bei etwa 60 kDa erkannte (Abbildung 3.7, Spur 6), war zunächst unklar, ob eine der beiden Banden von einer Kreuzreaktion mit dem ChR1-Protein stammen konnte. Zur Klärung dieser Frage war eine Westernblot-Analyse mit und ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol hilfreich, bei der zuerst eine Detektion mit dem anti-ChR2-Antikörper durchgeführt (Abbildung 3.14 a), und anschließend, nach Wiederablösung der Antikörper von der Membran (siehe Kapitel 5.6.4), die Detektion mit dem anti-ChR1-Antikörper wiederholt wurde (Abbildung 3.14 b). Dadurch konnten die entwickelten Filme exakt übereinander gelegt, und so eine Aussage über die Identität der mit dem anti-ChR2-Antikörper detektierten Banden gemacht werden. Die genaue Größe der Banden in beiden Detektionen ist durch die gestrichelten Linen verdeutlicht.



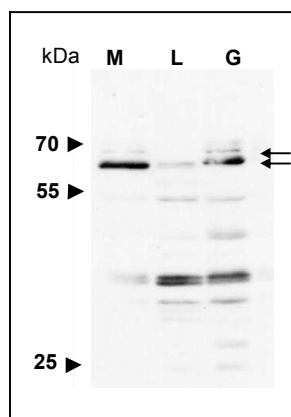
**Abbildung 3.14. Charakterisierung der Banden in ChR2- und ChR1-Westernblot-Analysen.** **a** Detektion von ChR2. **b** Detektion von ChR1 nach Wiederablösung der Antikörper von der Membran aus **a**. Die Westernblot-Analysen wurden mit Zellextrakten der Zellwandmutante *cw2* in Anwesenheit (+ β) und ohne (- β) β-Mercaptoethanol durchgeführt. Die gestrichelten Linien verdeutlichen die Zuordnung der Banden.

Während sich die Größe von *Channelrhodopsin 1* in Abwesenheit von β-Mercaptoethanol nach Auftrennung im SDS-Gel änderte (Abbildung 3.14 b, -β), konnte im Fall von ChR2 auch unter nicht reduzierenden Bedingungen die Doppelbande bei etwa 60 kDa detektiert werden (Abbildung 3.14 a, -β). Es war allerdings zu erkennen, dass sich das Verhältnis der Signalstärke der Doppelbande änderte. Während mit β-Mercaptoethanol die kleinere Bande stärker erkannt wurde, war ohne β-Mercaptoethanol das Signal der größeren Bande stärker. Bei beiden Banden musste es sich folglich um unterschiedliche Formen des ChR2-Proteins handeln, da ChR1 unter nicht reduzierenden Bedingungen vollständig zu einer Größe von 160 kDa verschoben war. Der anti-ChR2-Antikörper erkannte in der Westernblot-Analyse unter reduzierenden Bedingungen auch das ChR1-Protein bei etwa 70 kDa (Abbildung 3.14 a, +β, gestrichelte Linie Nr. 2), während unter nicht-reduzierenden Bedingungen ChR1 als schwache breite Bande bei etwa 150 – 160 kDa detektiert wurde (Abbildung 3.14 a, -β, gestrichelte Linie Nr. 1). Neben der Doppelbande bei etwa 60 kDa erkannte der anti-ChR2-Antikörper weitere Banden im Bereich von 20 bis 40 kDa, bei denen es sich möglicherweise um Abbauprodukte des ChR2-Proteins handeln könnte. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Somit war es möglich, ChR2 mit dem anti-ChR2-Antikörper zweifelsfrei in Westernblot-Analysen zu detektieren und von dem ChR1-Signal zu unterscheiden,

wenn die Zellextrakte ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol vorbereitet wurden. An dieser Stelle blieb jedoch unklar, worin sich die beiden ChR2-Banden unterschieden. Ein möglicher Zusammenhang mit dem Vorhandensein von intramolekularen Disulfidbindungen wird in Kapitel 4.4 diskutiert.

### 3.5 ChR2 ist in der Zellmembran lokalisiert

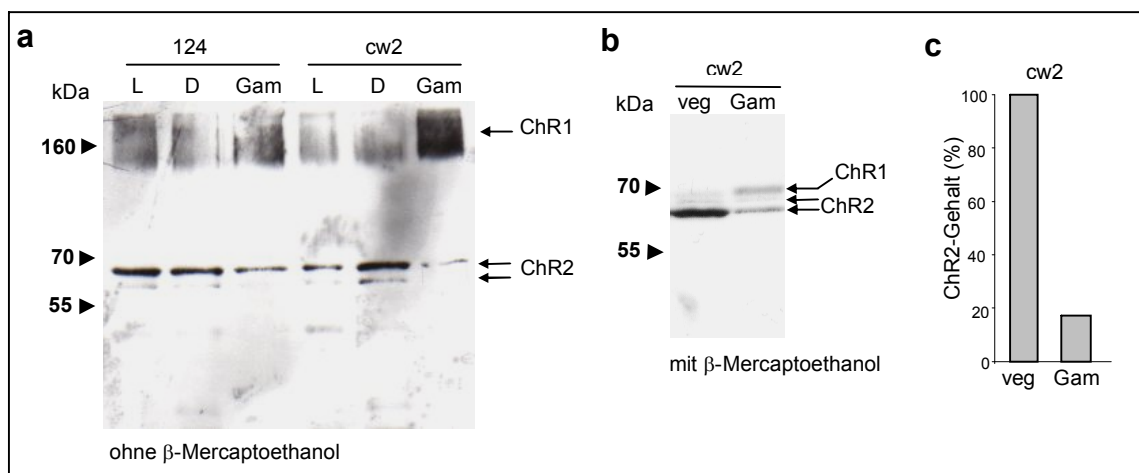
*Channelrhodopsin 2* enthält wie ChR1 sieben hypothetische Transmembrandomänen (Nagel et al., 2005) und sollte daher in der Zellmembran von *C. reinhardtii* lokalisiert sein. Um dies zu überprüfen, wurde ein Zellextrakt von vegetativen Zellen der Zellwandmutante *cw2* in eine Membranfraktion und eine lösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 100.000 g getrennt (siehe Kapitel 5.5.9) und in einer Westernblot-Analyse zusammen mit einem normalen Hitzeextrakt mit dem ChR2-Antikörper untersucht (Abbildung 3.15). Dabei konnte ChR2 fast ausschließlich in der Membranfraktion (Spur M) nachgewiesen werden, wobei sich die molekulare Größe der beiden Banden im Vergleich zum Gesamt-Zellextrakt (Spur G) nicht änderte. Die geringe Menge an ChR2 in der löslichen Fraktion (Spur L) könnte entweder von einer Kontamination mit ChR2-Protein aus der Membranfraktion oder aber von einer unvollständigen Präzipitation während der Abtrennung stammen. Somit handelte es sich bei ChR2 erwartungsgemäß ebenfalls um ein Membranprotein.



**Abbildung 3.15. Lokalisation von ChR2 in der Membranfraktion.** Westernblot-Analyse mit einer Membranfraktion (M), einer löslichen Fraktion (L) und einem Gesamt-Zellextrakt (G) der Zellwandmutante *cw2* analysiert mit dem anti-ChR2-Antikörper. Die Spuren M und L enthalten keine standardisierten Protein-Mengen.

### 3.5.1 cw2-Gameten enthalten nur eine geringe Menge an ChR2-Protein

Die Expression von *Channelrhodopsin 2* wurde ebenfalls unter verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert. Zur Unterscheidung der ChR2-spezifischen Signale von der Kreuzreaktion des anti-ChR2-Antikörpers mit dem ChR1-Protein (siehe Abbildung 3.14) wurden diese Westernblot-Analysen unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Da dabei das ChR1-Protein bekanntlich ein Molekulargewicht von mehr als 150 kDa besitzt (siehe Kapitel 3.3.4), konnte dieses dadurch gut von den zwei ChR2-Signalen bei etwa 60 kDa unterschieden werden. Das Ergebnis dieser Westernblot-Analyse ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Während die Stämme *CC124mf* und *cw2* ein identisches Expressionsmuster von ChR1 zeigten (siehe Kapitel 3.3.5), war die Expression von ChR2 in diesen beiden Stämmen unterschiedlich. Im Stamm *CC124mf* wurde ChR2 in vegetativen Zellen offensichtlich lichtunabhängig exprimiert, und Gameten enthielten eine etwas geringere Menge an ChR2 als vegetative Zellen (Abbildung 3.16 a). Vegetative Zellen der Zellwandmutante *cw2* exprimierten ChR2 stärker im Dunkeln, wobei die Expression von ChR2 in Gameten sehr stark reduziert war (Abbildung 3.16 a).



**Abbildung 3.16. ChR2-Expression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.** Westernblot-Analysen mit hitzedenaturierten *C. reinhardtii*-Zellextrakten und dem anti-ChR2-Antikörper. **a** nicht-reduzierende Bedingung in Abwesenheit von  $\beta$ -Mercaptoethanol **b** reduzierende Bedingung in Anwesenheit von  $\beta$ -Mercaptoethanol. **c** Quantifizierung des ChR2-Gehalts von Gameten im Vergleich zu vegetativen Zellen der Zellwandmutante *cw2*. 124: Wildtypstamm *CC-124mf*. *cw2*: Zellwandmutante *cw2*. L und veg: vegetative Zellen im Dauerlicht (70W/m<sup>2</sup>). D: vegetative Zellen in Dunkelheit (4 Tage). Gam: Gameten im Dauerlicht (70W/m<sup>2</sup>).

Die starke Reduktion von ChR2 in *cw2*-Gameten konnte auch in Westernblot-Analysen, die unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt worden sind, bestätigt werden (Abbildung 3.16 b). Hierbei detektierte der anti-ChR2-Antikörper neben den beiden Formen des ChR2-Proteins auch das ChR1-Protein (siehe Pfeile). Wie die Quantifizierung der ChR2 Signale aus Abbildung 3.16 b ergab, enthielten *cw2*-Gameten nur etwa 20 Prozent der ChR2-Menge von vegetativen Zellen. Die schwache Expression von ChR2 in *cw2*-Gameten war vor allem in Hinblick auf die in Kapitel 3.7 durchgeführten physiologischen Analysen von Bedeutung.

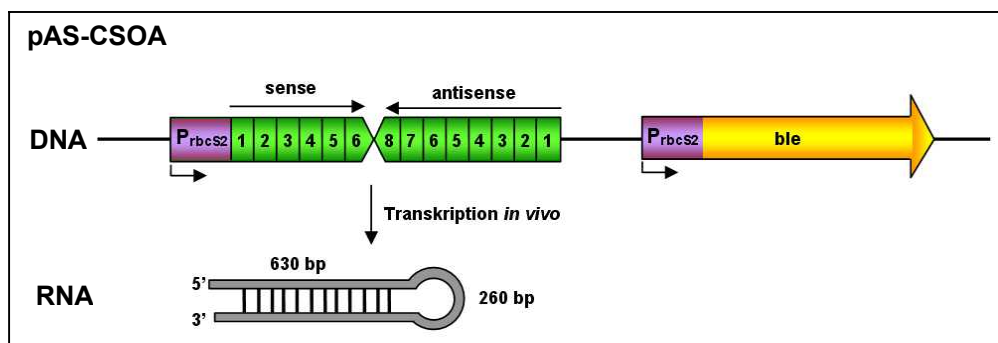
### **3.6 Analyse der Funktion von *Channelrhodopsin 1* durch *RNA-interference***

Die Funktion von *Channelrhodopsin 1* sollte mit der *RNA interference* (RNAi)-Methode *in vivo* untersucht werden. Mit Hilfe dieser mittlerweile auch in *Chlamydomonas* gut etablierten RNAi-Technik kann die Expression von Genen in lebenden Organismen abgeschaltet oder zumindest reduziert werden (Rosenberg et al., 1985; Fuhrmann et al., 2001; Rohr et al., 2004). Hierzu werden DNA-Konstrukte verwendet, die denselben Teil der codierenden Region eines Zielgens sowohl in *sense*- als auch in *antisense*-Orientierung hinter einem konstitutiven Promotor enthalten. Nach Transkription durch die RNA-Polymerase II entsteht *in vivo* durch Wechselwirkung des *sense*- und *antisense*-Stranges ein doppelsträngiges RNA-Haarnadelkonstrukt, das als Substrat für die Komponenten der zelleigenen *Silencing*-Maschinerie dient und schließlich zum Abbau der physiologischen mRNA des Zielgens führt, so dass kein Protein mehr gebildet werden kann (Baulcombe, 2004; Schroda, 2005).

Zur Herstellung von *C. reinhardtii* Transformanten mit reduziertem ChR1-Gehalt mittels der RNAi-Technik wurde der zellwand-defiziente Stamm *cw2* verwendet, da nur an diesem neben den Bewegungsanalysen auch die weiter unten beschriebenen elektrophysiologischen Messungen durchgeführt werden konnten. Die Transformation der *cw2*-Zellen erfolgte mit der Glasperlen-Methode (Kindle, 1990; siehe Kapitel 5.3).

### 3.6.1 ChR1-RNAi mit dem Plasmid pAS-CSOA

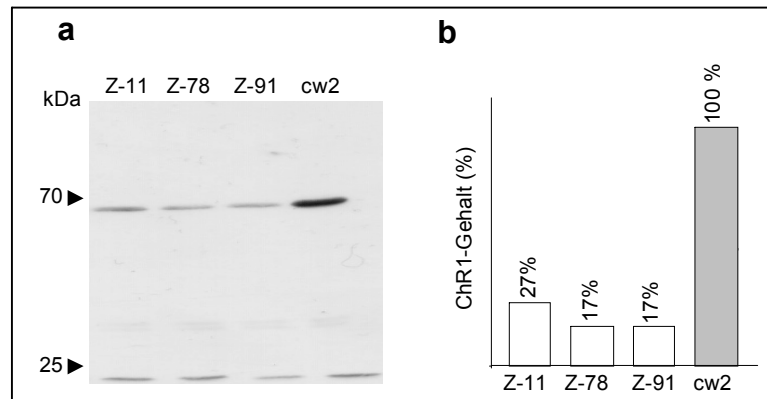
Das Plasmid pAS-CSOA (Abbildung 3.17; Sineshchekov et al., 2002) wurde freundlicherweise von John Spudich (Center for Membrane Biology, University of Texas Medical School, Houston) zur Verfügung gestellt. Das in diesem Plasmid enthaltene RNAi-Konstrukt enthielt den Bereich des ChR1-Gens von Exon 1 bis 6 in *sense*- und von Exon 1 bis 8 in *antisense*-Orientierung unter der Kontrolle des *rbcS2*-Promotors aus *C. reinhardtii*. Der doppelsträngige RNA-Bereich des Haarnadelkonstrukts war 630 bp lang (Exon 1-6), und der 260 bp lange Loop wurde durch die Basen der beiden Exons 7 und 8, die nur in einer Orientierung vorkommen, gebildet. Als Selektionsmarker für die Transformation von *C. reinhardtii* enthielt das Plasmid pAS-CSOA den Phleomycin-Resistenzmarker (Stevens et al., 1996). Dieser erlaubte die Selektion von Transformanten aufgrund ihrer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Zeocin.



**Abbildung 3.17. Schematische Darstellung des Plasmids pAS-CSOA und des gebildeten doppelsträngigen RNA-Haarnadelkonstruktes** (nach Sineshchekov et al., 2002). Das RNAi-Konstrukt mit Angabe der Exon-Bereiche ist grün dargestellt.  $P_{rbcS2}$ : Promotor des Ribulose-Bisphosphat-Oxygenase/ Carboxylase-Gens aus *C. reinhardtii* (violett). *ble*: Phleomycin-Resistenzgen (gelb). Das Haarnadelkonstrukt (grau) entsteht *in vivo* nach Transkription.

Nach Transformation des Stammes cw2 mit dem Plasmid pAS-CSOA wurden vegetative Zellen von insgesamt 172 Zeocin-resistenten Transformanten nach Anzucht in Flüssigmedium (siehe Kapitel 5.2.2) in Westernblot-Analysen auf einen reduzierten ChR1-Gehalt hin untersucht. Dabei konnten die drei Klone Z-11, Z-78 und Z-91 mit signifikant reduziertem ChR1-Gehalt identifiziert werden (Abbildung 3.18 a).





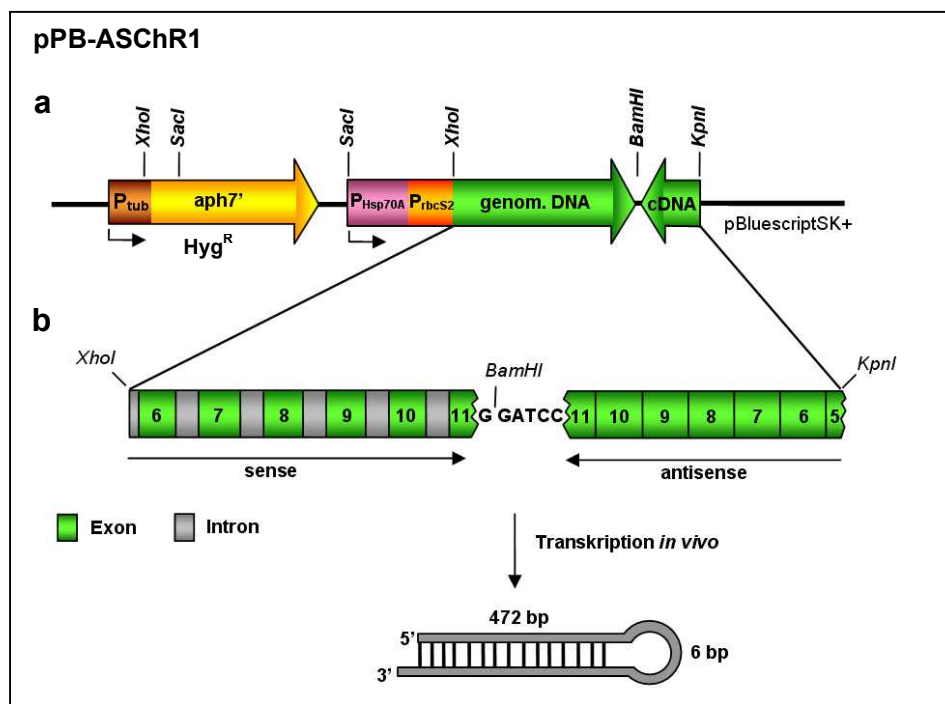
**Abbildung 3.18. Bestimmung des ChR1-Gehalts der RNAi-Transformanten mit pAS-CSOA.** **a** Western blot-Analyse von Zellextrakten der Zeocin-resistenten Transformanten Z-11, Z-78 und Z-91 sowie einer cw2-Kontrolle (cw2). **b** Quantifizierung der ChR1-Signale mit dem Programm Optiquant 2.50. Der ChR1-Gehalt wurde relativ zur cw2-Kontrolle (grau) berechnet.

Die densitometrische Auswertung der ChR1-Signale ergab eine Reduktion des ChR1-Gehaltes auf etwa 27 % bei Z-11 sowie auf 17 % bei Z-78 und Z-91 im Vergleich zu vegetativen Zellen einer untransformierten cw2-Kontrolle (Abbildung 3.18 b). Die lichtmikroskopische Analyse dieser ChR1-Mutanten zeigte, dass alle drei Transformanten immotil waren. Eine genauere Betrachtung ergab, dass die Flagellen von Z-11 stark verkürzt waren, Z-78 normal ausgebildete Flagellen besaß und Z-91 unbegeißelt war. Somit standen die drei immotilen ChR1-RNAi-Transformanten Z-11, Z-78 und Z-91 nur für elektrophysiologische Messungen (siehe 3.7.5) zur Verfügung, da aufgrund der fehlenden Motilität keine Bewegungsanalysen möglich waren. Bis zur weiteren Analyse wurden diese Transformanten auf HSA-Platten mit 250 mM Sorbitol im Dauerlicht (12 W/m<sup>2</sup>, 18 °C) kultiviert.

### 3.6.2 ChR1-RNAi mit dem Plasmid pPB-ASChR1

Die Transformation mit dem Plasmid pAS-CSOA hatte zwar zur Isolierung von Zelllinien mit reduziertem ChR1-Gehalt geführt, die jedoch alle immotil und somit für Bewegungsanalysen nicht geeignet waren. Da ein Grund für die Unbeweglichkeit in einer allgemeinen DNA-schädigenden Wirkung des verwendeten Antibiotikums Zeocin liegen könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit das RNAi-Plasmid pPB-ASChR1 (Abbildung 3.19 a) konstruiert. Dieses besaß ein dem offensichtlich funktionellen RNAi-Konstrukt im Plasmid pAS-CSOA sehr ähnliches RNAi-Konstrukt,

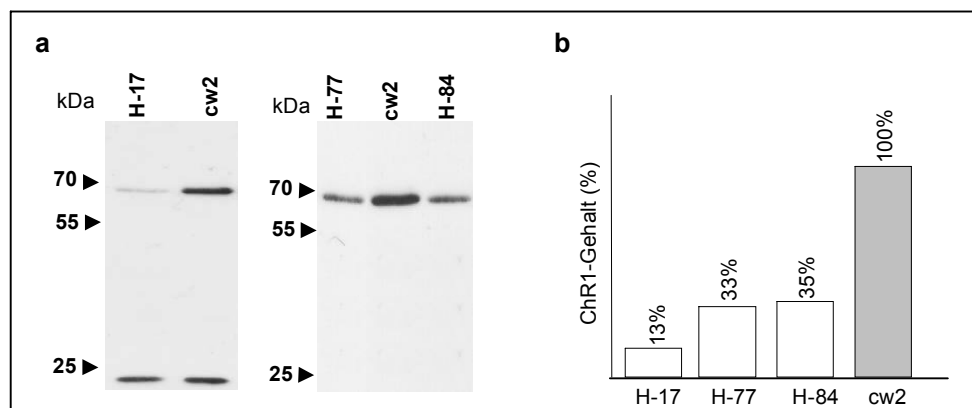
enthielt jedoch einen anderen Selektionsmarker. Bei diesem handelte es sich um ein Aminoglykosid-Phosphotransferasegen aus *Streptomyces hygroscopicus* (aph7<sup>R</sup>; Zalacain et al., 1987), das in modifizierter Form die Resistenz gegen Hygromycin B auch in *C. reinhardtii* vermittelt (Berthold et al., 2002). Das Plasmid pPB-ASChR1 enthielt ein RNAi-Konstrukt für ChR1 unter der Kontrolle eines konstitutiven Hybridpromotors bestehend aus dem Hsp70A- und rbcS2-Promotor von *C. reinhardtii* (Schroda et al., 2000). Das RNAi-Konstrukt wurde von Dr. Suneel Kateriya im Plasmid pXX15-ASChR1 zur Verfügung gestellt. Es enthielt den Bereich der Exons 6 bis 11 in *sense*- und *antisense*-Orientierung, wobei in den *sense*-Strang zusätzlich die ursprünglichen Introns des ChR1-Gens aus diesem Abschnitt eingefügt waren, die nach der Transkription durch den Spleißvorgang im Zellkern aus der RNA entfernt werden sollten. Dies sollte die Expression des Konstruktes verbessern (Fuhrmann et al., 2001).



**Abbildung 3.19. Schematische Darstellung des RNAi-Konstruktes pPB-ASChR1.** **a** Übersichtsdarstellung: das antisense-Konstrukt unter der Kontrolle des Hsp70A/rbcS2-Hybridpromotors ist grün und der Hygromycin-Selektionsmarker (Hyg<sup>R</sup>) unter der Kontrolle des *C. reinhardtii*  $\beta$ -Tubulinpromotors (*P<sub>tub</sub>*) gelb dargestellt. **b** Detaildarstellung des Antisens-Konstruktes. Exons sind grün und Introns grau dargestellt. Die Pfeile verdeutlichen die *sense*- und *antisense*-Orientierung. Das Haarnadelkonstrukt (grau) entsteht *in vivo* nach Transkription. Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

Der doppelsträngige RNA-Bereich war 472 bp lang und die Schleife des Haarnadelkonstruktes wurde durch einen 6 bp langen Linker, eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle, gebildet (Abbildung 3.19 b). Da dieses Plasmid keinen Selektionsmarker für die Transformation von *C. reinhardtii* enthielt, wurde der aph7''-Resistenzmarker gegen Hygromycin B aus dem Plasmid pHyg3 (Berthold et al., 2002) in die *Nae*I-Schnittstelle des Plasmids pXX15A-ASChR1 integriert.

Das Plasmid pPB-ASChR1 wurde ebenfalls in die *C. reinhardtii*-Zellwandmutante *cw2* transformiert. Insgesamt wurden vegetative Zellen von 179 Hygromycin B-resistenten Transformanten in Westernblot-Analysen auf den Gehalt an ChR1-Protein hin untersucht. Dabei konnten nur der Klon H-17 mit sehr stark reduziertem ChR1-Gehalt und die zwei Klone H-77 und H-84 mit geringerer ChR1-Reduktion identifiziert werden. (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20 Bestimmung des ChR1-Gehalts der RNAi-Transformanten mit pPB-ASChR1.** **a** Westernblot-Analysen von Zellextrakten der Hygromycin B-resistenten Transformanten H-17, H-77 und H-84 sowie einer *cw2*-Kontrolle (*cw2*). **b** Quantifizierung der ChR1-Signale mit dem Programm Optiquant 2.50 (Packard Instruments). Der ChR1-Gehalt wurde relativ zur *cw2*-Kontrolle (grau) berechnet.

Bei der Transformation mit pPB-ASChR1 waren nur 4 der 179 untersuchten Transformanten nicht schwimmfähig, was einer Immotilitätsrate von nur 2 % entsprach. Die densitometrische Auswertung der ChR1-Signale ergab einen ChR1-Gehalt von 13% bei H-17, 33% für H-77 und 35% bei H-84 im Vergleich zum nicht-transformierten *cw2*-Stamm. Die Transformante H-17 zeigte unter dem Mikroskop das normale Bewegungsmuster von *cw2*-Zellen. H-77 war zwar motil, allerdings bewegten sich die Zellen wesentlich langsamer als vegetative *cw2*-Zellen und wiesen einen „zittrigen“ Schwimmstil auf, und von H-84 schwammen nur sehr wenige Zellen, so dass diese beiden Transformanten für Bewegungs- und Lichtstreuanalysen nicht

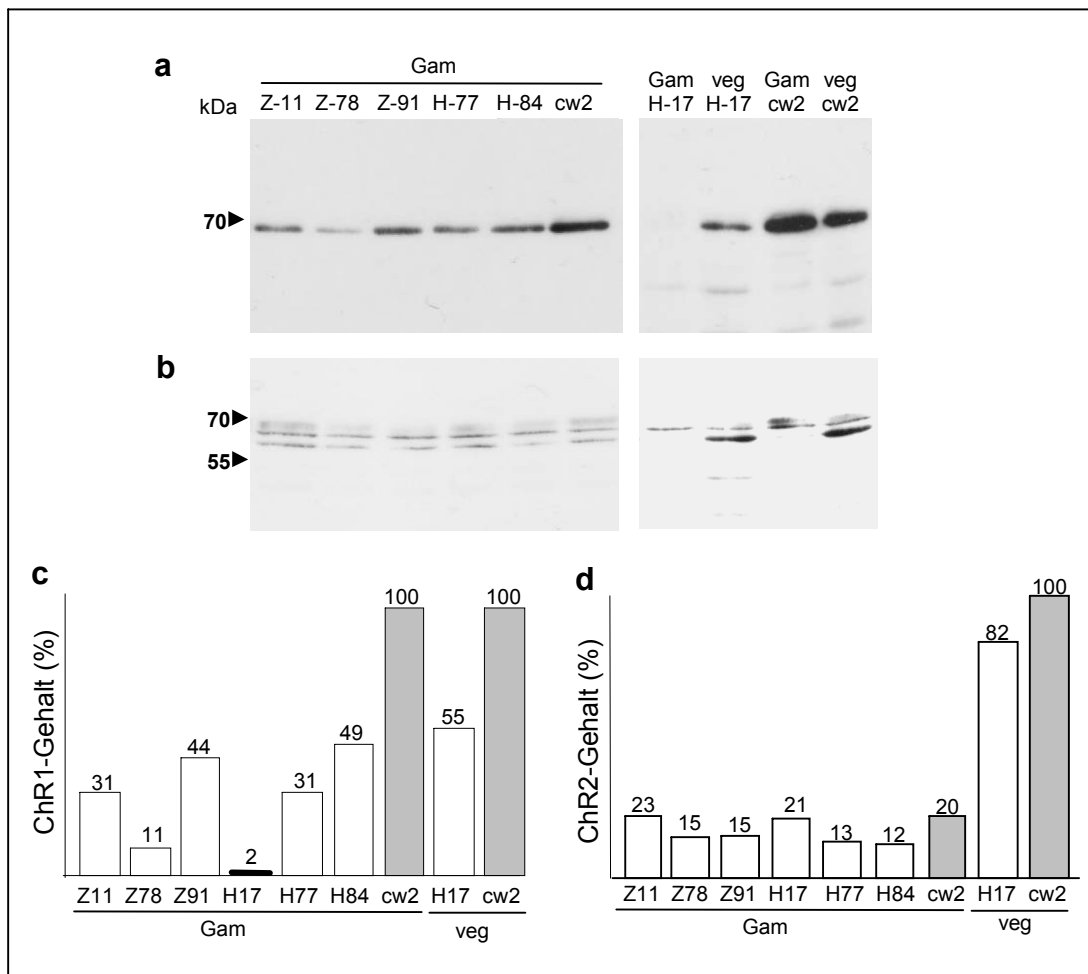
geeignet waren. Die Transformanten H-17, H-77 und H-84 wurden bis zur weiteren Analyse auf HSA-Platten mit 250 mM Sorbitol im Dauerlicht (12 W/m<sup>2</sup>, 18 °C) kultiviert.

### 3.7 Physiologische Analyse der ChR1-RNAi-Transformanten

Mit den in den vorherigen Kapiteln 3.6.1 und 3.6.2 beschriebenen ChR1-RNAi-Transformanten sollten physiologische Analysen durchgeführt werden, um die Funktion von ChR1 in *C. reinhardtii* in Bezug auf lichtinduzierte Bewegungsantworten aufzuklären. Für die Analyse der lichtabhängigen Bewegungsreaktionen konnte nur die Transformante H-17 verwendet werden, da alle übrigen ChR1-Mutanten nicht schwimmfähig waren. Als erstes sollte in einem einfachen Phototaxis-Assay die phototaktische Reaktion der H-17-Mutante auf Tageslicht untersucht werden. Außerdem sollte mittels Lichtstreuemessungen die phototaktische Orientierung der Zellen auf monochromatisches Licht der Wellenlängen 450, 505 und 530 nm und die photophobische Reaktion auf sättigende Lichtblitze ( $\lambda = 500 \pm 40$  nm) mittels einer computergestützten Bildverarbeitung analysiert werden. Schließlich sollte an allen in dieser Arbeit generierten ChR1-RNAi-Transformanten mittels der Saugelektrodentechnik untersucht werden, ob die an Einzelzellen messbaren Photoströme durch die ChR1-Reduktion beeinflusst werden. In dem für die Kulturhaltung verwendeten HSA-Medium ist üblicherweise Sorbitol in einer Konzentration von 250 mM für die osmotische Stabilisierung der Zellwandmutante *cw2* vorhanden. Da Sorbitol aber sowohl die Phototaxis, als auch die elektrophysiologischen Messungen negativ beeinflusst (P. Hegemann, persönliche Mitteilung), wurde für die physiologischen Untersuchungen auf Sorbitol im Medium verzichtet.

### **3.7.1 Die ChR1-Reduktion ist in H-17 Gameten besonders stark ausgeprägt**

Für die Interpretation der Bewegungs- und Lichtstreu-Analysen sowie der elektrophysiologischen Messungen war die Kenntnis der ChR1-Reduktion und des ChR2-Gehalts der verwendeten ChR1-RNAi-Transformanten zum Zeitpunkt der Messung sehr wichtig ist. Deshalb wurde parallel zu jeder Messung eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Hierzu wurde unmittelbar vor Beginn der Messung ein Zellextrakt für nach Standardbedingungen (siehe 3.3.1) präpariert. Ein Befund dieser Westernblot-Analysen war, dass die RNAi-Transformanten eine zeitlich stabile ChR1-Reduktion aufwiesen, so dass die in Abbildung 3.21 dargestellten Westernblot-Analysen das Maß der ChR1-Reduktion für die im folgenden durchgeführten Messungen widerspiegeln. Während in vegetativen Zellen der Mutante H-17 der ChR1-Gehalt auf etwa 47 Prozent im Vergleich zu vegetativen *cw2*-Zellen reduziert war, betrug der ChR1-Gehalt in Gameten dieser Mutante nur noch etwa 2 Prozent im Vergleich zu *cw2*-Gameten. In den Gameten der Transformanten Z-11, Z-78, Z-91, H-77 und H-84 war der ChR1-Gehalt auf etwa 11 bis 49 Prozent im Vergleich zu *cw2*-Gameten reduziert (Abbildung 3.21 a). Den parallel durchgeführten ChR2-Westernblot-Analysen ist zu entnehmen, dass die Expression von ChR2 nicht durch das ChR1-RNAi-Konstrukt beeinflusst wurde (Abbildung 3.21 b). Die untersuchten Zelllinien zeigten das typische Expressionsmuster von ChR2 in vegetativen Zellen und Gameten der Zellwandmutante *cw2* unter reduzierenden Bedingungen, wobei Gameten nur etwa 10 bis 20 Prozent der ChR2-Menge von vegetativen Zellen enthielten (Abbildung 3.21 d). Aufgrund der Tatsache, dass Gameten der Mutante H-17 praktisch kein ChR1-Protein mehr aufwiesen, und ChR2 in *cw2*-Gameten natürlicherweise ebenfalls stark reduziert war, kam der Mutante H-17 eine besondere Bedeutung zu. Nur an dieser Mutante konnten, im Gegensatz zu den übrigen immotilen RNAi-Transformanten, neben elektrophysiologischen Messungen gleichzeitig auch Bewegungsanalysen durchgeführt und die Ergebnisse aller im Rahmen dieser Arbeit möglichen physiologischen Untersuchungsmethoden miteinander verglichen werden.

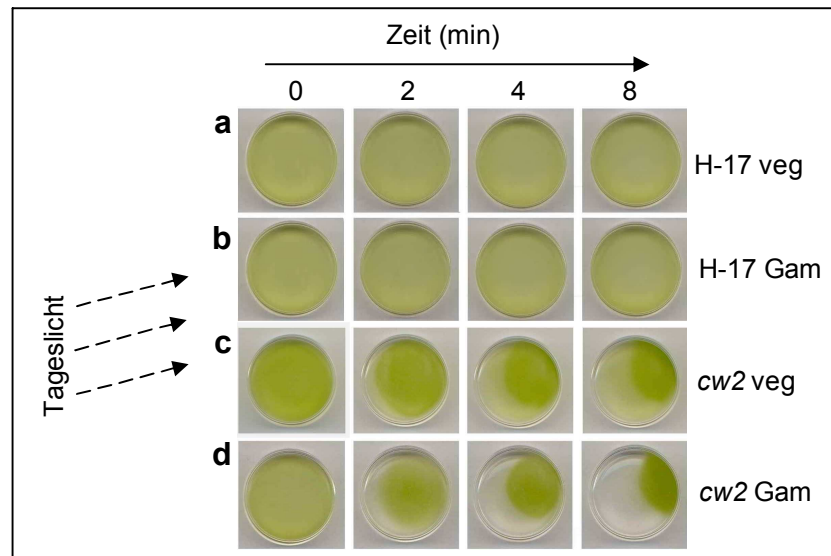


**Abbildung 3.21. Westernblot-Analysen der physiologisch untersuchten ChR1-RNAi-Transformanten.** **a** Detektion von ChR1. **b** Detektion von ChR2. **c** und **d** Quantifizierung des ChR1- bzw. ChR2-Gehalts der untersuchten RNAi-Zelllinien (weiß) im Vergleich zur untransformierten cw2-Kontrolle (grau). Gam: Gameten. veg: vegetative Zellen.

### 3.7.2 Die Reduktion von ChR1 führt zum Verlust der Phototaxis bei Zellen der Mutante H-17

Eine dem Tageslicht ausgesetzte Kultur von *C. reinhardtii*-Zellen zeigt ein deutlich negativ phototaktisches Schwimmverhalten. Die phototaktisch aktiven Zellen akkumulieren mit der Zeit auf der dem Licht abgewandten Seite des Kulturgefäßes oder einer Petrischale. Dieses Verhalten erlaubte es, die Phototaxis der motilen RNAi-Mutante H-17 mit reduziertem ChR1-Gehalt zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass sowohl vegetative Zellen (Reduktion von ChR1 auf 50 Prozent) als auch Gameten (Reduktion von ChR1 auf unter 2 Prozent) der Mutante H-17 nicht mehr mit negativer Phototaxis auf Tageslicht reagierten (Abbildung 3.22 a und b), während

untransformierte *cw2*-Zellen eine stark ausgeprägte negative Phototaxis zeigten (Abbildung 3.22 c und d).



**Abbildung 3.22. Phototaxis-Assay mit der Mutante H17 und *cw2*-Zellen.**

Die gestrichelten Pfeile symbolisieren den Einfall des Tageslichts. Der Zeitpunkt der Aufnahme nach Beginn der Lichtexposition ist angegeben (durchgehender Pfeil). **a:** H17 vegetative Zellen. **b:** H17 Gameten. **c:** *cw2* vegetative Zellen. **d:** *cw2*-Gameten. Lichtintensität: etwa 5 W/m<sup>2</sup>.

Dieses relativ einfache Experiment zeigte deutlich, dass bereits eine Reduktion der ChR1-Menge um 50 Prozent ausreicht, um die phototaktische Reaktion dieser Zellen auf Tageslicht zu verhindern.

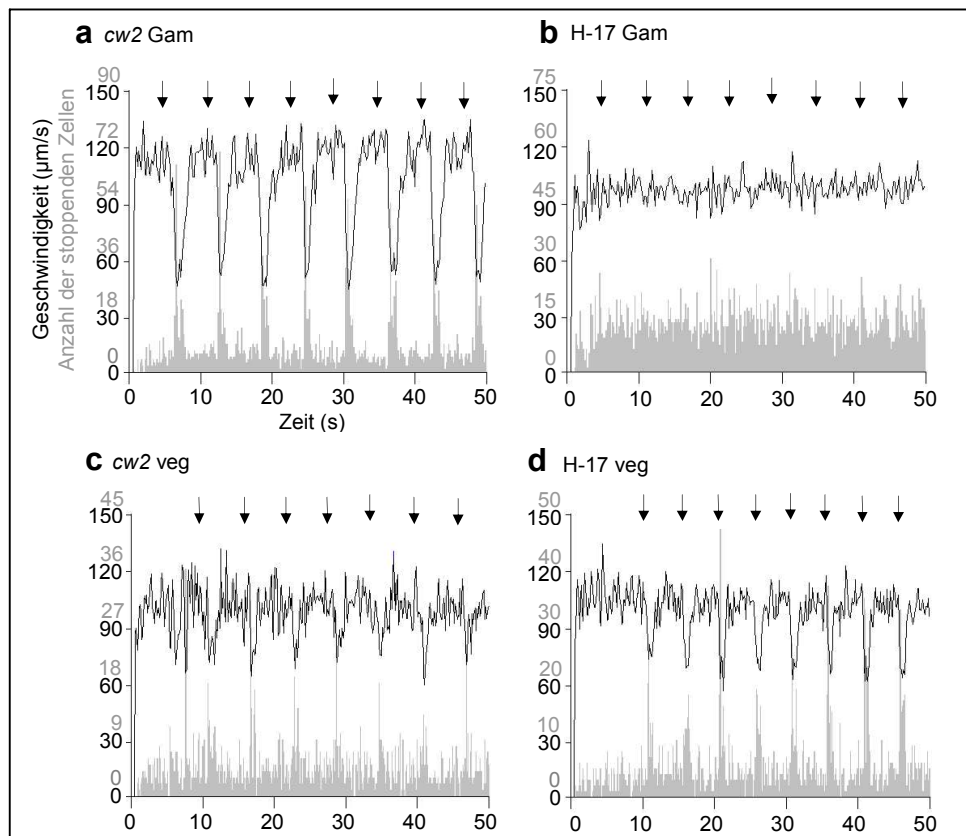
### 3.7.3 Die Gameten der Mutante H-17 zeigen keine photophobische Reaktion

*C. reinhardtii* führt in Folge eines Lichtblitzes eine photophobische Reaktion (Stopp-Reaktion) aus, während dieser die Zellen kurzzeitig ihre Vorwärtsbewegung stoppen, rückwärts schwimmen, erneut stoppen und schließlich wieder vorwärts weiter schwimmen (Hegemann & Bruck, 1989). Dabei kommt es zu einer vorübergehenden Änderung des Schlagmusters der Flagellen vom so genannten Brust- (vorwärts) in den Kraulstil (rückwärts), welche durch den Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Flagellenstrom ausgelöst wird (Holland et al., 1997). Bei den Ionenkanälen, die den Flagellenstrom erzeugen, handelt es sich um spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, die in der

Flagellenmembran lokalisiert sind und sich öffnen, wenn die durch den Photorezeptorstrom  $I_{P1}$  hervorgerufene Depolarisation der Membran einen bestimmten oberen Schwellenwert überschreitet (Harz et al., 1992). Im folgenden sollte untersucht werden, ob die Reduktion von ChR1 die photophobische Reaktion der Mutante H-17 beeinflusst. Die photophobische Reaktion konnte über eine Aufzeichnung der Schwimmgeschwindigkeit analysiert werden. Dazu wurde die Bewegung der Zellen im Dunkelfeld-Mikroskop über eine Videokamera aufgezeichnet und deren Schwimmgeschwindigkeit mit dem Programm *Wintrack 2000 XP* (siehe Kapitel 5.8) ermittelt. Da die Zellen bei der photophobischen Reaktion kurzzeitig stoppten, war dies an einem Abfall der Schwimmgeschwindigkeit erkennbar. Die Parameter des Programms wurden dabei so eingestellt, dass nur Zellen mit einer minimalen Schwimmgeschwindigkeit von 50  $\mu\text{m/s}$  erfasst wurden. Die Anzahl der jeweils analysierten Zellen, aus denen schließlich die Schwimmgeschwindigkeit ermittelt wurde, lag jeweils zwischen 120 und 170.

Die Untersuchung des photophobischen Verhaltens von *cw2* Gameten zeigte, dass diese in Folge eines Lichtblitzes ( $\lambda = 500 \pm 40 \text{ nm}$ ) mit einer sättigenden Intensität von  $4 \times 10^{22} \text{ Photonen/m}^2$  bei einer mittleren Schwimmgeschwindigkeit von 120  $\mu\text{m/s}$  eine ausgeprägte Stopp-Reaktion durchführen (Abbildung 3.23 a). Die Gameten der ChR1-Mutante H-17, bei denen kein ChR1-Signal in Westernblot-Analysen nachzuweisen war (Abbildung 3.21), schwammen allgemein mit einer niedrigeren mittleren Geschwindigkeit von 90  $\mu\text{m/s}$  und zeigten keine photophobische Antwort in Folge des Lichtstimulus (Abbildung 3.23 b). Die Stopp-Reaktion von vegetativen *cw2*-Zellen, die eine mittlere Schwimmgeschwindigkeit von 100  $\mu\text{m/s}$  besaßen, fiel nicht so deutlich aus wie bei den Gameten, war aber noch gut zu erkennen (Abbildung 3.23 c). Die vegetativen Zellen der Transformante H-17, die noch etwa 50 Prozent an ChR1-Protein enthielten (Abbildung 3.21), zeigten eine mit *cw2*-Zellen vergleichbare Stopp-Reaktion und hatten eine mittlere Schwimmgeschwindigkeit von 100  $\mu\text{m/s}$  (Abbildung 3.23 d).





**Abbildung 3.23. Analyse der Stopp-Reaktion von cw2-Zellen und der Mutante H-17.** Die Schwimmgeschwindigkeiten (schwarze Kurven) wurden mit dem Programm *Wintrack 2000 XP* (Real Time Computers, Erlangen) aufgezeichnet. **a** cw2-Gameten, **b** H-17-Gameten, **c** cw2 vegetative Zellen, **d** H-17 vegetative Zellen. Die Pfeile symbolisieren die Applikation des Lichtblitzes ( $\lambda=500\text{nm}$ , Halbwertsbreite = 20 nm, Intensität:  $4 \times 10^{22}$  Photonen/ $\text{m}^2$ ). Die grauen Kurven stellen die Anzahl der Zellen dar, die zum jeweiligen Mess-Zeitpunkt eine Verminderung der Schwimmgeschwindigkeit um mindestens 50 Prozent zeigen. Die Beschriftung der Achsen in a gilt für auch für b – d.

Aus dem minimalen Gehalt an ChR1-Protein in H-17 Gameten und dem Ausbleiben der Stopp-Reaktion in diesen Gameten lässt sich folgern, dass ChR1 in *C. reinhardtii* eine essentielle Rolle bei der photophobischen Reaktion spielt.

### 3.7.4 Untersuchung der phototaktischen Orientierung der Mutante H-17 mittels Lichtstreuung

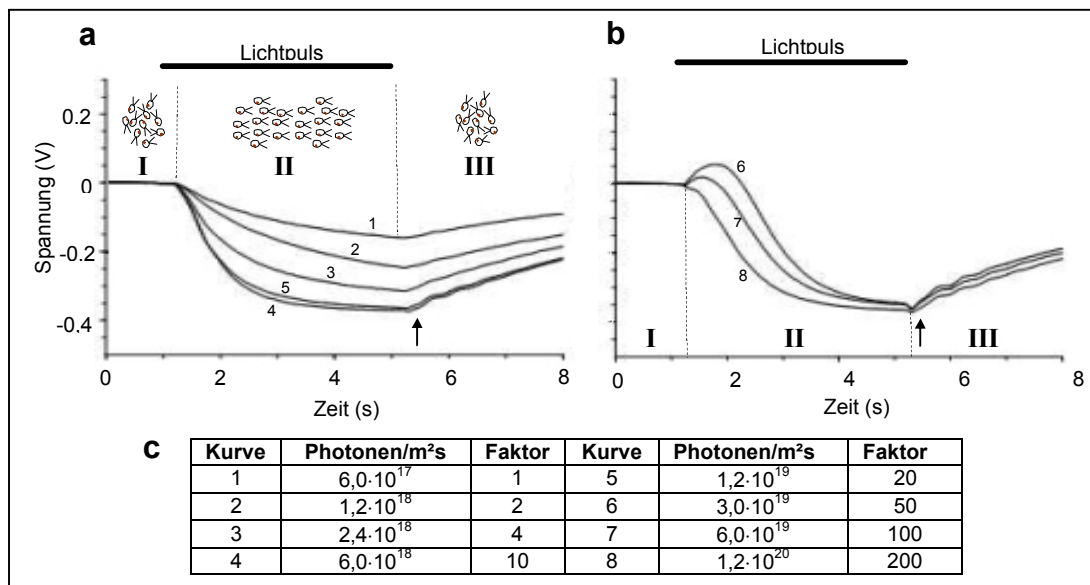
Die getrennte elektrophysiologische Untersuchung der *Channelrhodopsine 1* und 2 in *Xenopus*-Oozyten (Nagel et al., 2002 und 2003) hatte ergeben, dass ChR1 die höchste Sensitivität im grünen Wellenlängenbereich bei 500 nm aufweist, während

ChR2 die größte Sensitivität im blauen Wellenlängenbereich bei 450 nm besitzt. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass ChR1 für lichtabhängige Bewegungsreaktionen im grünen Wellenlängenbereich verantwortlich ist. Der Ausfall dieser Abhängigkeit bzw. die Verschiebung der Sensitivität in den blauen Bereich sollte sich auch auf die phototaktische Orientierung von *C. reinhardtii*-Zellen der Mutante H-17 auf monochromatisches Licht auswirken. Die phototaktische Orientierung von *C. reinhardtii* kann mit der Lichtstreuapparat von Uhl & Hegemann (1990) gemessen werden. Während die Phototaxis über einen relativ langen Zeitraum (mehrere Minuten) an Hand der Akkumulation von Zellen auf der dem Licht abgewandten Seite bestimmt wurde (siehe Kapitel 3.7.2), kann mit der hier angewandten Lichtstremessung die lichtinduzierte Orientierungsänderung einer Zellpopulation nach einen *step up*-Reiz mit einer hohen Zeitauflösung (innerhalb von Sekunden) bestimmt werden. Im Unterschied zu Uhl & Hegemann (1990) und Schaller et al. (1997) wurden in dieser Arbeit als Lichtquelle Hochleistungs-LEDs eingesetzt, die monochromatisches Licht der Wellenlängen 455, 505 und 530 nm erzeugten. Durch die Messung bei diesen Wellenlängen sollte eine Differenzierung zwischen ChR1 und ChR2 in Hinblick auf die Phototaxis ermöglicht werden.

#### **3.7.4.1 Lichtstreusignale von cw2-Zellen**

Zunächst wurden in einem Vorversuch Lichtstremessungen an vegetativen Zellen des cw2-Stammes durchgeführt und die erhaltenen Messkurven näher charakterisiert. In Abhängigkeit der Lichtintensität ergaben sich dabei zwei charakteristische Messkurvenformen, die in Abbildung 3.24 gezeigt werden. Nach Einschalten des Lichts, beginnen sich die Zellen nach einer Latenzzeit von etwa 75  $\mu$ s im Licht auszurichten. Wie eine parallele Video-Analyse (o. Abbildung) zeigte, reagierten die Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen bei niedrigen Lichtintensitäten mit negativer Phototaxis, d. h. sie schwammen von der Lichtquelle weg. Dies führte zu einem Abfall der Messkurven (Abbildung 3.24, a). Bei hohen Lichtintensitäten zeigten die Zellen zu Beginn des Lichtpulses eine transiente Phase positiver Phototaxis bzw. orientierten sich zur Lichtquelle hin. Dies führte zu einer kurzzeitig positiven Steigung der Kurven. Dabei nahm die Dauer der positiv phototaktischen Orientierung mit steigender Lichtintensität zu (Abbildung 3.24, b). Nach Ende des Lichtpulses konnte man eine so genannte „step-down“-Antwort

(Pfeile) beobachten, die mit steigender Intensität und Dauer des Lichtpulses stärker wurde und eine Mischung von Richtungsänderungen und Stopp-Reaktionen („*step down loops*“) darstellt (Hegemann und Bruck, 1989).

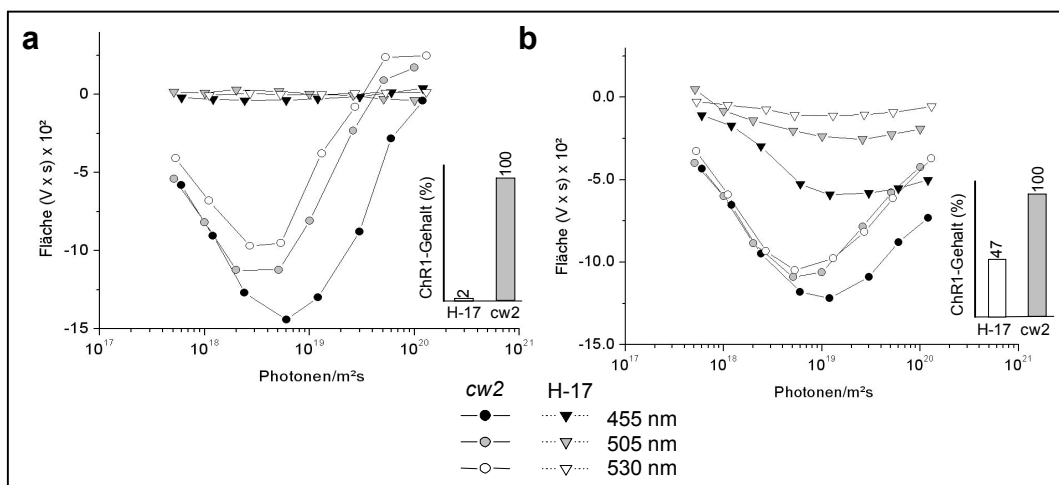


**Abbildung 3.24. Lichtstreu-Signale am Beispiel von vegetativen *cw2*-Zellen.** **a** Kurven bei niedrigen Lichtintensitäten. **b** Kurvenverlauf bei hohen Lichtintensitäten. Die Kurven entstanden durch Mittelung von zwei unabhängigen Lichtstreu-Messungen an verschiedenen Kulturen. Der schwarze Balken symbolisiert die Dauer des Lichtpulses. Die römischen Ziffern zeigen die drei Phasen des Lichtstreu-Signals: I unorientierter Zustand, II Orientierung, III Rückkehr in den unorientierten Zustand. Die Pfeile markieren den Beginn der „*step-down*“-Antwort. **c** Lichtintensitäten der verwendeten LED ( $\lambda = 455\text{nm}$ ) in Photonen/m²s. Die Lichtintensitäten wurden mittels Neutralglasfilter eingestellt.

Für die grafische Auswertung wurde als Maß für die phototaktische Aktivität die Fläche zwischen Messkurve und Nulllinie berechnet. Hierbei waren sowohl negative als auch positive Werte möglich, da die positiven Flächenanteile bei hohen Lichtintensitäten (Abbildung 3.24 b) mit den negativen verrechnet wurden. Auf diese Weise konnte aufgrund des Vorzeichens der Gesamtfläche auch eine Aussage über die vorwiegende Orientierungsrichtung der gemessenen Kultur gemacht werden. Negative Werte entsprachen einer Orientierung von der Lichtquelle weg (negative Phototaxis) und positive zeigten eine Orientierung zur Lichtquelle hin (positive Phototaxis) an.

### 3.7.4.2 Die Reduktion von ChR1 führt zum Verlust der phototaktischen Orientierung in Gameten der Mutante H-17

Im folgenden wurde das phototaktische Verhalten der ChR1-RNAi-Mutante H-17 im Vergleich zu Zellen des *cw2*-Stamms analysiert, um eine mögliche Auswirkung der Stilllegung der ChR1-Expression in H-17 auf die Orientierungsreaktion dieser Zellen zu untersuchen. Während Gameten des *cw2*-Stammes in Lichtstreuanalysen bei allen verwendeten Wellenlängen (450, 505 und 530 nm) ein ausgeprägtes phototaktisches Orientierungsverhalten zeigten (Abbildung 3.25 a), wiesen die Gameten der ChR1-RNAi-Transformante H-17, die nur noch etwa 2 Prozent der Menge an ChR1-Protein von *cw2*-Gameten enthielten (Abbildung 3.21 a, Spur 1 und Spur 3), praktisch keine phototaktische Aktivität mehr auf. Außerdem enthielten Gameten des *cw2*-Stammes natürlicherweise eine im Vergleich zu vegetativen Zellen stark reduzierte Menge an ChR2-Protein (Abbildung 3.21 b). Die Lichtstreuungsmessung an vegetativen Zellen der Mutante H-17 (Abbildung 3.25 b), die im Vergleich zu *cw2*-Zellen noch etwa 47 Prozent an ChR1-Protein enthielten (Abbildung 3.21 a), ergab, dass diese im Vergleich zu vegetativen *cw2*-Zellen eine deutlich schwächere phototaktische Orientierung vor allem bei 505 und 530 nm aufwiesen. Die relativ starke Reaktion von vegetativen Zellen der Mutante H-17 bei 455 nm könnte von dem nur in vegetativen *cw2*-Zellen vorhandenen ChR2-Protein verursacht werden, dass bekanntlich die stärkste Sensitivität bei etwa 450 nm besitzt (Nagel et al., 2003).



**Abbildung 3.25. Lichtstreuungsmessung an *cw2*-Zellen und der Transformante H-17.**  
**a** Gameten. **b** vegetative Zellen. Die Kurven stellen eine Mittelung von zwei unabhängigen Messungen an verschiedenen Tagen dar. Die Diagramme zeigen den ChR1-Gehalt der verwendeten Zellen in Prozent relativ zur *cw2*-Kontrolle.

Weiterhin zeigte sich, dass das Vorzeichen der Phototaxis sowohl in Gameten, als auch in vegetativen Zellen von der Lichtintensität abhängig war. Während bei niedrigen Lichtintensitäten unter den gewählten Versuchsbedingungen (Ionenzusammensetzung des Messpuffers, Lichtadaptation der Zellen vor der Messung) die negative Phototaxis dominierte, was an der Abnahme der Flächenwerte in Abbildung 3.25 zu erkennen ist, zeigten Gameten ab einer Lichtintensität von etwa  $4 \cdot 10^{18}$  Photonen/m<sup>2</sup>s und vegetativen Zellen ab  $8 \cdot 10^{18}$  Photonen/m<sup>2</sup>s ein zunehmend positiv phototaktisches Verhalten, was sich in der Zunahme der Flächenwerte widerspiegelt.

Die Ergebnisse dieser Lichtstreuanalysen lassen zusammen mit denen der Analysen der Phototaxis bei Tageslicht (siehe Kapitel 3.7.2) und der photophobischen Reaktion (siehe Kapitel 3.7.3) die Schlussfolgerung zu, dass die lichtabhängigen Bewegungsreaktionen in *C. reinhardtii* entscheidend von der *Channelrhodopsin 1*-Konzentration bestimmt werden.

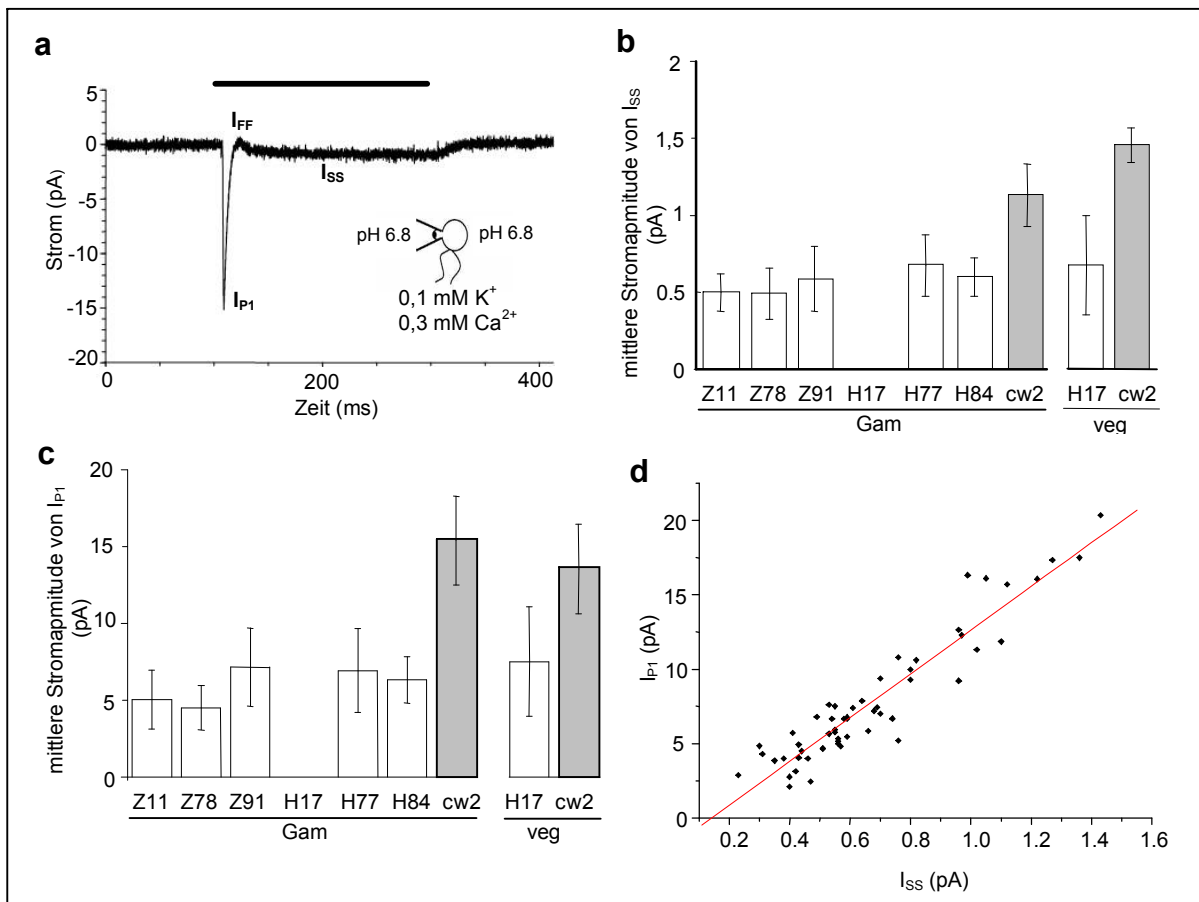
### 3.7.5 ChR1-Mutanten zeigen reduzierte Photoströme

Da es sich bei *Channelrhodopsin 1* um einen lichtgesteuerten Ionenkanal handelt, der eine starke Leitfähigkeit für Protonen besitzt (Nagel et al., 2002), sollte die Reduktion von ChR1 in den RNAi-Transformanten die Amplitude des stationären Protonenstrom  $I_{SS}$  beeinflussen. Sofern die für den transienten Strom  $I_{P1}$  verantwortlichen spannungsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Kanäle durch die von  $I_{SS}$  hervorgerufene Depolarisation der Zellmembran aktiviert werden, sollte sich die Reduktion von ChR1 auch auf die Amplitude von  $I_{P1}$  auswirken. Da die elektrophysiologischen Messungen bei einer Protonenkonzentration von pH 4, bei der der Protonenstrom  $I_{SS}$  eine vielfach größere Amplitude besitzt als bei pH 6.8 (siehe Kapitel 2.4), in dieser Arbeit aus bisher unbekannten Gründen nicht rekonstruiert werden konnten wurden die Saugelektrodenmessungen bei pH 6.8 durchgeführt. Hierzu wurden die ChR1-RNAi-Transformanten mit einem 300 ms dauernden Lichtpuls der Wellenlänge  $500 \pm 40$  nm und einer sättigenden Lichtintensität von  $3 \cdot 10^{22}$  Photonen/m<sup>2</sup>s stimuliert, wodurch sowohl der transiente Photorezeptorstrom  $I_{P1}$  als auch der bei pH 6.8 sehr kleine stationäre Protonenstrom  $I_{SS}$  detektiert werden konnten (Abbildung 3.26 a). Der Flagellenstrom  $I_{FF}$  war unter

diesen Bedingungen kaum detektierbar. Eine Schwierigkeit bei den elektrophysiologischen Messungen an *C. reinhardtii* ist die Tatsache, dass die Größe der gemessenen Stromamplitude davon abhängt, ob der Augenfleck der Lichtquelle zu- oder abgewandt ist (Harz et al., 1992), dies aber beim Einsaugen der Zellen in die Pipette nicht systematisch kontrolliert werden kann. Folglich variierte die Position des Augenflecks bei den verschiedenen Messungen, weshalb Stromamplituden, die an verschiedenen Zellen gemessen wurden, nicht direkt miteinander verglichen werden konnten. Zur statistischen Absicherung der Messungen wurde deshalb das folgende Verfahren gewählt: der Messvorgang wurde für jede RNAi-Transformante und die *cw2*-Kontrolle so oft wiederholt, bis insgesamt jeweils 9 Einzelzellen erfolgreich gemessen worden waren, d. h. der leichter erkennbare Photorezeptorstrom  $I_{P1}$  abgeleitet worden war. Die Stromamplitude blieb dabei unberücksichtigt. Aus jeweils 9 Einzelmessungen wurde die mittlere Stromamplitude für  $I_{SS}$  (Abbildung 3.26 b) bzw.  $I_{P1}$  (Abbildung 3.26 c) ermittelt. Man erkennt, dass die mittlere Stromamplituden von  $I_{SS}$  und  $I_{P1}$  bei allen ChR1-RNAi-Transformanten deutlich unter der mittleren Amplitude der *cw2*-Kontrollen lag. Der aus 9 Zellen gemittelte stationäre Strom  $I_{ss}$  besaß in der *cw2*-Kontrolle erwartungsgemäß eine Amplitude von etwa 1,5 pA und war in den ChR1-RNAi-Transformanten um etwa die Hälfte auf 0,5 – 0,7 pA reduziert (Abbildung 3.26 b). Der transiente Strom  $I_{P1}$  besaß in den *cw2*-Kontrollen eine Amplitude von etwa 15 pA und war in den ChR1-RNAi-Transformanten ebenfalls deutlich auf etwa 5 – 8 pA reduziert. Ein besonderer Fall zeigte sich bei der Transformante H-17. An H-17-Gameten, in denen kein ChR1-Protein mehr nachzuweisen war (Abbildung 3.21) konnten die Ströme  $I_{SS}$  und  $I_{P1}$  auch an insgesamt 100 gemessenen Einzelzellen nicht mehr abgeleitet werden. In vegetativen Zellen hingegen, die noch etwa 47 Prozent an ChR1 enthielten (Abbildung 3.21), waren die Ströme  $I_{SS}$  und  $I_{P1}$  auf etwa die Hälfte im Vergleich zu den Kontrollen reduziert.

Sofern der transiente  $Ca^{2+}$ -Strom  $I_{P1}$  durch den stationären Protonenstrom  $I_{SS}$  ausgelöst wird, sollte der Strom  $I_{P1}$  eine Abhängigkeit von der Amplitude des stationären Stroms  $I_{SS}$  aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurden die Stromamplituden aller an Gameten gemessenen transienten  $I_{P1}$ -Ströme gegen die stationären  $I_{SS}$ -Stromamplituden aufgetragen (Abbildung 3.26 d). Mittels einer mit dem Programm Origin 7 durchgeführten Regressionsanalyse konnte die Geradengleichung  $y = 14,7 \cdot x - 2,1$  ermittelt werden, wobei sich ein

Korrelationskoeffizient von 0,94 ergab. Dies bestätigte eine sehr starke positive lineare Abhängigkeit des  $I_{P1}$ -Stromes vom stationären Strom  $I_{SS}$ . Außerdem zeigte sich, dass die lineare Regressionsgerade nicht durch den Nullpunkt verlief, sondern die x-Achse bei etwa 0,14 schnitt. Diese bedeutet, dass die für den transienten Strom  $I_{P1}$  verantwortlichen spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle erst ausgelöst werden, wenn der Protonenstrom  $I_{SS}$  eine Amplitudengröße von etwa 0,14 pA erreicht.



**Abbildung 3.26. Augenströme von ChR1-RNAi-Transformanten und Kontrollen.** **a** Typische Stromspur von *cw2*-Gameten nach einem Lichtpuls (schwarzer Balken).  $I_{P1}$ : transienter  $Ca^{2+}$ -abhängiger Photorezeptorstrom.  $I_{SS}$ : stationärer Protonenstrom.  $I_{FF}$ :  $Ca^{2+}$ -abhängiger Flagellenstrom. Die Messung erfolgte bei pH 6,8 und bei einer Wellenlänge von  $500 \pm 40$  nm und einer sättigenden Lichtintensität von  $3 \cdot 10^{22}$  Photonen/m<sup>2</sup>s. Der Augenfleck befand sich dabei in der Messpipette (siehe Grafik). **b** Diagramm der mittleren  $I_{SS}$ -Stromamplitude mit Standardabweichung (Fehlerbalken) von je 9 gemessenen Zellen. **c** Diagramm der mittleren  $I_{P1}$ -Stromamplitude mit Standardabweichung (Fehlerbalken) von je 9 gemessenen Zellen. Gam: Gameten. veg: vegetative Zellen. Die *cw2*-Kontrollen sind grau dargestellt. **d** Abhängigkeit der beiden Ströme  $I_{P1}$  und  $I_{SS}$ . Es wurden jeweils die an den Gameten gemessenen Stromamplituden aus b und c aufgetragen. Die rote Linie stellt die mit dem Programm Origin (Version 7.0) ermittelte Regressionsgerade dar.

Die elektrophysiologischen Analysen der ChR1-RNAi-Zellen, vor allem der Mutante H-17, stehen im Einklang mit den bisher erzielten Ergebnissen und deuten sehr stark darauf hin, dass es sich bei ChR1 um den verantwortlichen Kanal für den stationären Protonenstrom  $I_{SS}$  handelt, der auch für die Generierung des Kalzium-abhängigen Photorezeptorstroms  $I_{P1}$  verantwortlich ist. *Channelrhodopsin 1* spielt somit eine zentrale Rolle in der Photorezeption von *C. reinhardtii*.

### 3.8 Lokalisation von ChR1 und ChR2 durch Immunfluoreszenz

In elektrophysiologischen Experimenten an *C. reinhardtii* konnte der Augenfleck als der Ort identifiziert werden, an dem die Ionenkanäle lokalisiert sind, die für die Erzeugung von lichtinduzierbaren Photoströmen verantwortlich sind (Harz und Hegemann, 1991). Es ist bis heute nicht bekannt, um welche Photorezeptorproteine es sich dabei handelt. *Channelrhodopsin 1* und *2* sind lichtgesteuerte Ionenkanäle (Nagel et al., 2002 und 2003), weshalb die Vermutung nahe liegt, dass diese im Augenfleck lokalisiert sein könnten und für die lichtinduzierten Augenströme in *C. reinhardtii* verantwortlich sind. Immunfluoreszenzlokalisationen in einer Arbeit von Suzuki et al. (2003), die mit einem anti-ChR1-Peptidantikörper durchgeführt wurden, ließen ebenfalls vermuten, dass ChR1 im Augenfleck lokalisiert ist. Diese Bilder zeigten neben einem Signal, das dem Ort des Augenflecks zugeordnet werden kann, interessanterweise ein weiteres deutliches Signal im Bereich des Basalkörpers, das in dieser Arbeit nicht diskutiert wurde.

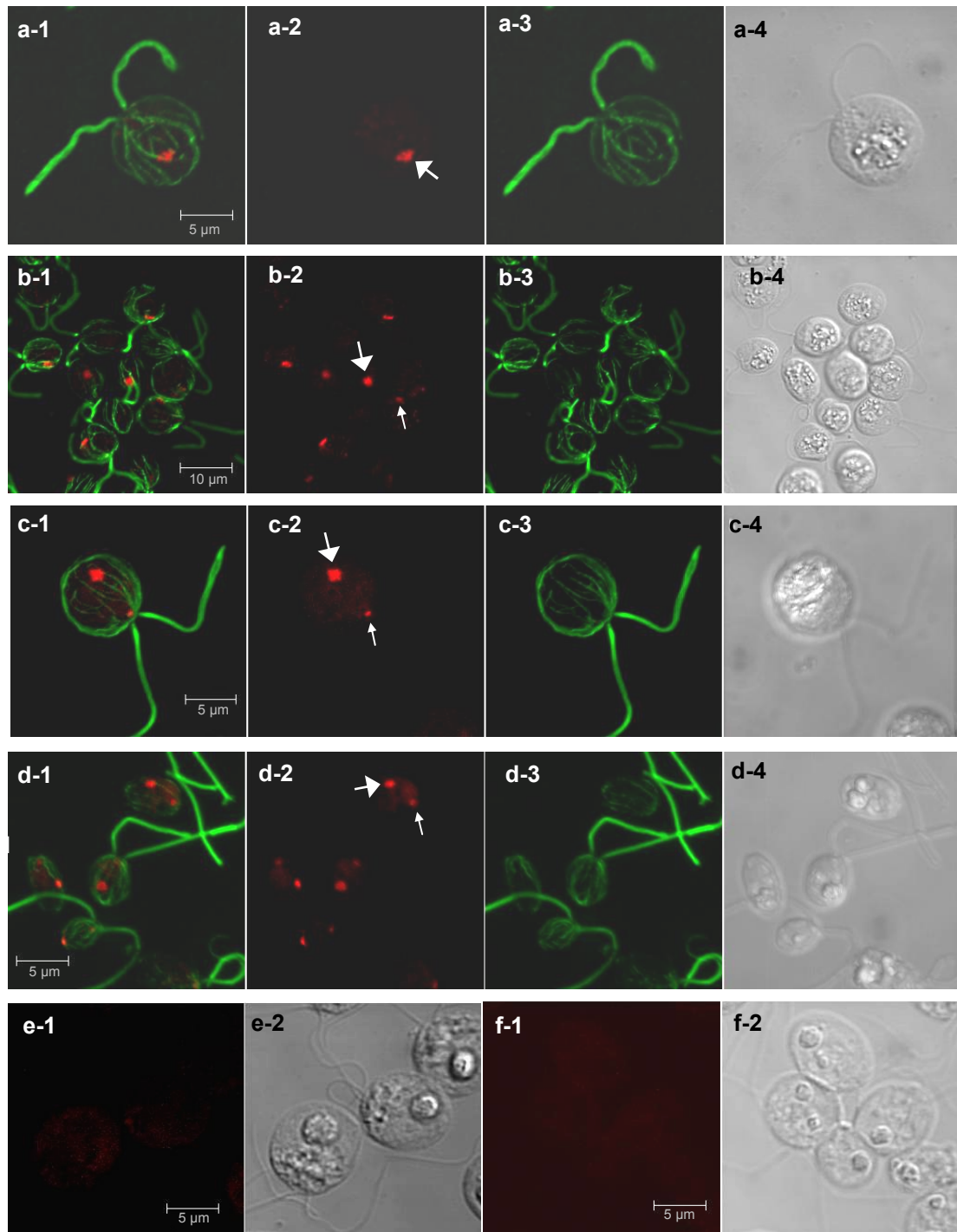
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Immunfluoreszenzanalysen mit den in dieser Arbeit generierten anti-ChR1- bzw. anti-ChR2-Antisera durchgeführt. Die Zielsetzung dabei war, eine bessere Einordnung der jeweiligen Signale in den zellulären Gesamtkontext zu erhalten. Deshalb wurden zur gleichzeitigen Darstellung des Zytoskeletts Kolokalisationen mit einem monoklonalem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antiserum (B-5-1-2, Fa. Sigma-Aldrich) an Wildtypzellen des Stammes *CC124mt* durchgeführt. Dabei wurden ChR1- bzw. ChR2-spezifische Signale im roten und  $\alpha$ -Tubulin-Signale im grünen Kanal detektiert. Wildtypzellen wurden verwendet, weil bei ihnen im Vergleich zu Stämmen mit Zellwanddefekten (wie z. B. *cw2*) die Zellform während der Präparation wesentlich besser erhalten werden kann. Die Ergebnisse dieser Lokalisationsexperimente werden im folgenden unter 3.8.1 und 3.8.2 beschrieben.



Versuche zur Lokalisation der ChR1- und ChR2-Proteine in den ChR1-RNAi-Zelllinien, die möglicherweise sehr interessante Ergebnisse versprachen, wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls durchgeführt, ergaben aber keine verwertbaren Ergebnisse (ohne Abbildung). Der Grund lag vermutlich darin, dass es sich bei den RNAi-Zelllinien um Derivate des zellwanddefekten Stammes *cw2* handelte, und dass wegen der generell größeren Fragilität dieser Zellen die Zellform während der Präparation für die Immunfluoreszenzmikroskopie bei diesen ersten Experimenten nicht ausreichend gut erhalten werden konnte.

### 3.8.1 Immunolokalisation von ChR1

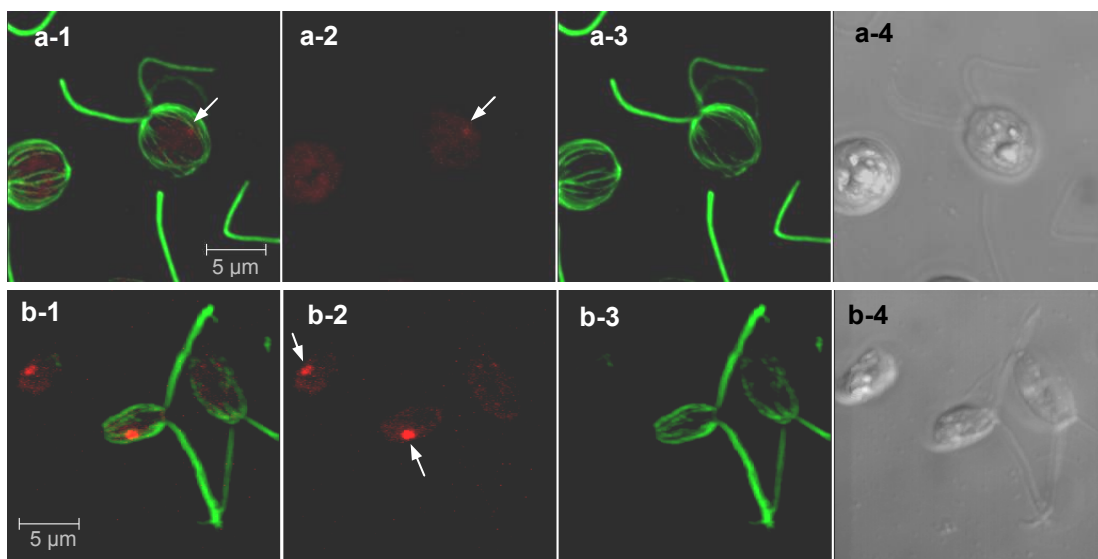
Das Ergebnis der Immunolokalisation des ChR1-Proteins zeigt Abbildung 3.27. In vegetativen begeißelten Wildtypzellen wurde immer ein unregelmäßig geformter Fleck von etwa 1-2 µm Durchmesser im Zellkörper detektiert (Abbildung 3.27 a-c), der aufgrund seiner Position in der Nähe des Zelläquators im Bereich des Augenflecks lokalisiert sein könnte. Zusätzlich zeigten etwa 5-10 Prozent der vegetativen Zellen ein zweites und schwächeres ChR1-Signal in der Basalkörperregion (Abbildung 3.27 c). Demgegenüber zeigten Gameten durchgängig zwei deutliche Signale im Zellkörper und in der Basalkörperregion (Abbildung 3.27 d). Kontrollen ohne primäre Antiseren (Abbildung 3.27 e-1) bzw. ohne sekundäre Antiseren (Abbildung 3.27 e-1 und f-1) zeigten auch bei vierfach akkumulierter Signalintensität erwartungsgemäß keines der beschriebenen Signale. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass bei den vorliegenden Experimenten spezifische Lokalisationsmuster des ChR1-Proteins von *C. reinhardtii* beschrieben wurden. Ob es sich auch bei dem Signal in der Basalkörperregion um das ChR1-Protein handelt ist fraglich, da durch Saugelektrodenmessungen an *cw2*-Gameten, bei denen der Augenfleck entfernt worden war, keine Photoströme mehr abgeleitet werden konnten (Braun, 1997).



**Abbildung 3.27. ChR1-Immunfluoreszenz am Wildtypstamm *CC-124mt<sup>-</sup>*.**  
**a – c** vegetative Zellen. **d** Gameten. **e** Kontrolle nur mit sekundärem Antikörper. **f** Kontrolle nur mit ChR1-Antikörper. 1 Kolokalisation von ChR1 und  $\alpha$ -Tubulin, 2 Lokalisation von ChR1, 3 Lokalisation von  $\alpha$ -Tubulin, 4 Phasenkontrastbild. Großer Pfeil: Signal im Bereich des Augenflecks. Kleiner Pfeil: Signal an der Basalkörperregion.

### 3.8.2 Immunolokalisation von ChR2

Bei der Immunfluoreszenz-Analyse mit dem anti-ChR2-Antikörper konnte in vegetativen Zellen ähnlich wie bei ChR1 ein Signal im Bereich des Augenflecks detektiert werden (Abbildung 3.28 a und b, Pfeile). Dieses war jedoch deutlich schwächer als das ChR1-Signal, weshalb für eine einwandfreie Detektion von ChR2 die Signal-Verstärkung bei der Detektion um den Faktor zwei erhöht werden musste. Zudem war der Bereich des Augenflecks in weniger als 10 Prozent der untersuchten Zellen markiert. Die Basalkörperregion war in vegetativen Zellen nicht markiert. Gameten zeigten ebenfalls kein Signal in der Basalkörperregion, aber eine deutliche Markierung im Bereich des Augenflecks (Abbildung 3.28 c und d), die stärker war als die in vegetativen Zellen.



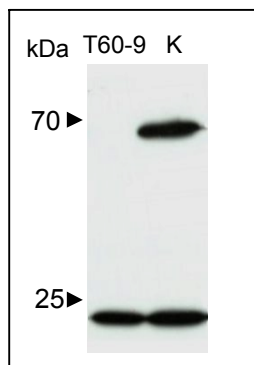
**Abbildung 3.28. ChR2-Immunfluoreszenz am Wildtypstamm *CC-124mt<sup>-</sup>*.** **a** vegetative Zellen. **b** Gameten. 1 Kolokalisation von ChR1 (rot) und  $\alpha$ -Tubulin (grün), 2 Lokalisation von ChR1, 3 Lokalisation von  $\alpha$ -Tubulin, 4 Phasenkontrastbild. Die Pfeile markieren die ChR2-spezifischen Signale im Bereich des Augenflecks. Kontrolle mit sekundärem Antikörper siehe Abbildung 3.27 e.

Aufgrund der starken Kreuzreaktion des anti-ChR2-Antikörpers mit dem ChR1-Protein in den Westernblot-Analysen mit Zellextrakten des Wildtypstammes *CC124mt<sup>-</sup>* (Abbildung 3.16) blieb an dieser Stelle unklar, wie Groß der Anteil des ChR1-Proteins an den ChR2-Signalen war.

## 4 Diskussion

### 4.1 Expression von *Channelrhodopsin 1* in *C. reinhardtii*

Der in dieser Arbeit hergestellte polyklonale anti-ChR1-Antikörper erlaubte es, das Photorezeptorprotein *Channelrhodopsin 1* in Westernblot-Analysen mit hitzedenaturierten Zellextrakten von *C. reinhardtii* zu identifizieren. Das aus 712 Aminosäuren aufgebaute ChR1 besaß erwartungsgemäß ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa und konnte mit dem gereinigten anti-ChR1-Antikörper zweifelsfrei nachgewiesen werden (Abbildung 3.7, Spur 3). Dies steht im Einklang mit parallel durchgeführten Arbeiten von Suzuki et al. (2003) und Govorunova et al. (2004). Beide Gruppen verwendeten unterschiedliche anti-ChR1-Peptidantikörper und konnten ChR1 in Westernblot-Analysen ebenfalls als etwa 70 kDa großes Protein identifizieren, was das Ergebnis dieser Arbeit untermauert. Aufgrund einer Westernblot-Analyse mit einer ChR1-Mutante, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der vom anti-ChR1-Antikörper erkannten 20 kDa-Bande um ein ChR1-spezifisches Signal handelte. Bei dieser Mutante war das ChR1-Gen durch einen Gen-*Knockout* zerstört worden (Boris Zorin, persönliche Mitteilung). Folglich konnte in einer von Boris Zorin durchgeführten Westernblot-Analysen (Abbildung 4.1) mit Zellextrakten dieser Mutante kein ChR1-Signal bei 70 kDa mehr detektiert werden. Da der Antikörper weiterhin die Bande bei 20 kDa erkannte, musste es sich dabei um ein noch unbekanntes Protein von *C. reinhardtii* handeln, welches vom anti-ChR1-Antikörper erkannt wurde.



**Abbildung 4.1. ChR1-Knockout-Mutante T60-9.** Westernblot-Analyse von *C. reinhardtii*-Zellextrakten mit anti-ChR1-Antikörper. T60-9: ChR1-Knockout-Mutante generiert mit dem Stamm *cw15arg<sup>-</sup>A*. K: *cw15arg<sup>-</sup>A* – Kontrolle. (Mit freundlicher Genehmigung von Boris Zorin).

## 4.2 Lichtabhängige Expression von ChR1

In asynchronen Kulturen konnte bei Wachstum unter Licht- und Dunkelbedingungen kein Unterschied in der Expression von ChR1 festgestellt werden. Dies deutet in erster Linie darauf hin, dass durch Licht kein Abbau von ChR1 stattfindet, wie dies beispielsweise bei dem pflanzlichen Photorezeptor Phytochrom der Fall ist (Quail, 1984). Vielmehr weisen die experimentellen Daten darauf hin, dass die Expression von ChR1 circadian gesteuert wird. Nach Synchronisierung einer asynchronen Kultur der Zellwandmutante *cw2* durch eine 72-stündige Dunkelphase (Kondo et al., 1990) wurde nach Überführung dieser ins Licht eine Abnahme des Chop1-Gehalts um über 60 Prozent während der ersten 12 Stunden beobachtet, bevor diese innerhalb der nächsten 12 Stunden wieder etwa 80 Prozent der Ausgangsmenge erreichte (siehe Kapitel 3.3.6.). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache, dass die Phototaxis von *C. reinhardtii* von der circadianen Uhr gesteuert wird (Bruce, 1970; Kondo et al. 1990). Dies bedeutet, dass die phototaktische Aktivität der Algenzellen im Laufe von 24 Stunden schwankt, was unter anderem durch die Veränderung der Expression des Photorezeptorproteins ChR1 hervorgerufen werden könnte.

## 4.3 Expression von ChR2

Da es sich auch bei *Channelrhodopsin 2* um einen lichtgesteuerten Ionenkanal handelt (Nagel et al., 2003), und eine Funktion von ChR2 für lichtinduzierten Bewegungsantworten von *C. reinhardtii* postuliert wurde (Sineshchekov et al, 2000; Govorunova et al., 2004), war im Zusammenhang mit der Funktionsanalyse von ChR1 in RNAi-Mutanten auch die Kenntnis der Expression von ChR2 in diesen Mutanten von großer Bedeutung. Der gereinigte anti-ChR2-Antikörper erkannte in Westernblot-Analysen bis zu drei Banden, deren Molekulargewicht zwischen 60 und 70 kDa lag (siehe Kapitel 3.4). Wie die weiteren Untersuchungen zeigten, handelte es sich bei den beiden Banden mit niedrigerem Molekulargewicht um ChR2-spezifische Signale, während die in einigen Westernblot-Analysen detektierte Bande mit einem Molekulargewicht bei etwa 70 kDa dem ChR1-Protein zuzuordnen war. Dies geht aus den Westernblot-Analysen unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen (siehe Kapitel 3.4.1) eindeutig hervor. In der Arbeit von

Fuhrmann et al. (2004) konnte mittels einer Reportergenanalyse gezeigt werden, dass die Aktivität des Promotor des ChR2-Gens lichtabhängig ist und in Dunkelheit eine stärkere Aktivität besitzt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der ChR2-Expression ergab, dass ChR2 auch in der Zellwandmutante *cw2* in Abwesenheit von Licht stärker exprimiert wurde, was mit dem Ergebnis von Fuhrmann et al. (2004) übereinstimmt. Der Wildtypstamm *CC124mt* hingegen zeigte keine eindeutige Lichtabhängigkeit der ChR2-Expression. Die Ergebnisse der Expressionanalysen von ChR2 deuten darauf hin, dass verschiedene *C. reinhardtii*-Stämme offensichtlich Unterschiede in der ChR2-Expression aufweisen (siehe auch Kapitel 4.9).

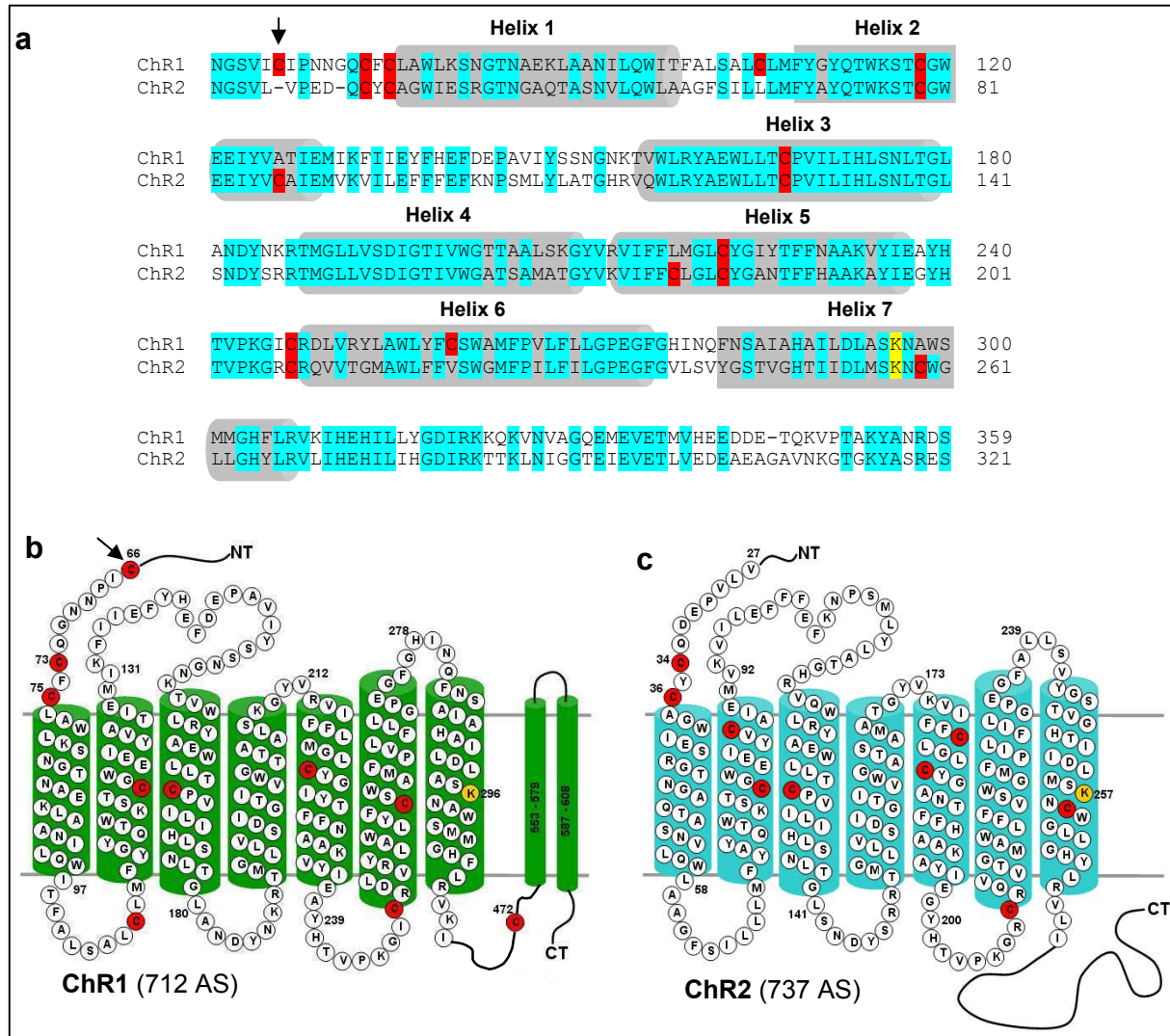
#### **4.4 Cysteine beeinflussen die Konformation von ChR1 und ChR2**

Die Aminosäure Cystein besitzt eine Sulfhydryl- (SH-) Gruppe, die in eukaryontischen Zellen durch eine enzymatischen Oxidationsreaktion mit einem weiteren Cystein eine kovalente Disulfidbindung (S-S-Bindung) ausbilden kann. Disulfidbindungen entstehen während der Proteinfaltung im *Endoplasmatischen Retikulum*. Intra-molekulare Disulfidbindungen zwischen Cysteinen der selben Polypeptidkette führen zur Stabilisierung der Tertiärstruktur (z. B. Rinder-*Rhodopsin*) während inter-molekulare Disulfidbindungen zwischen verschiedenen Proteinen zur Erhaltung der Quartärstruktur in Multiproteinkomplexen (z. B. Antikörper) beitragen. Wie aus den Ergebnissen in Kapitel 3.3.4 und 3.4.1 hervorgeht, enthält *Channelrhodopsin 1* mindestens eine *in vivo* ausgebildete Disulfidbindung. Während nach Reduktion der Disulfidbindungen durch Behandlung mit dem Thio-Alkohol  $\beta$ -Mercaptoethanol ChR1 im SDS-Gel als scharfe Bande bei etwa 70 kDa läuft, besitzt nicht-reduziertes ChR1 ein Molekulargewicht von etwa 150 – 160 kDa (Abbildung 3.11). Dies bedeutet, dass es sich bei der nativen Form von ChR1 um ein Dimer handelt, wobei die Interaktion der beiden Proteinpartner auf einer kovalenten Disulfidbindung beruht. An Hand der in dieser Arbeit erhaltenen Daten kann nicht entschieden werden, ob es sich dabei um ein Homodimer aus zwei ChR1-Molekülen oder aber um ein Heterodimer mit einem noch unbekannten Protein aus *C. reinhardtii* handelt (siehe Kapitel 3.3.4). Im Falle von ChR2 ändert sich das Laufverhalten der Doppelbande im SDS-Gel in Abwesenheit von  $\beta$ -Mercaptoethanol nicht (Abbildung

3.14). ChR2 kann nach wie vor als Doppelbande bei etwa 60 kDa detektiert werden. Allerdings scheint sich unter nicht-reduzierenden Bedingungen die Verteilung von ChR2 zugunsten der oberen Bande zu verschieben. ChR1 und ChR2 enthalten beide im Bereich der Transmembranregion je neun Cysteinreste und ChR1 besitzt zusätzlich noch ein weiteres Cystein im C-terminalen Bereich an Aminosäureposition 472 (Abbildung 4.2). Disulfidbindungen können nur stabil zwischen Cysteinen ausgebildet werden, die sich außerhalb des reduzierenden Milieus des Zytosols befinden. Im Falle von ChR1 liegen nur die Cysteine an Position 66, 73 und 75 außerhalb des Zytosols auf der extrazellulären Seite der Zellmembran (Abbildung 4.2). Folglich kann eine Disulfidbindung nur im N-Terminus über eines dieser drei extrazellulären Cysteine ausgebildet werden.

Ein Vergleich der sehr homologen Aminosäuresequenzen und Sekundärstrukturen von ChR1 und ChR2 (Abbildung 4.2) zeigt, dass das Cystein an Position 66 für diese Disulfidbindung in Frage kommen könnte, da die Cysteine 73 und 75 auch im ChR2-Protein an homologer Stelle (Position 34 und 36) vorkommen, und ChR2 bekanntlich keine intermolekulare Disulfidbindung besitzt (siehe Kapitel 3.4.1).

Allerdings deuten die Westernblot-Analysen in Kapitel 3.4 darauf hin, dass ChR2 intra-molekulare Disulfidbindungen enthalten könnte. Bei reduzierenden Bedingungen ist die Intensität der etwas kleineren ChR2-Bande stärker, während bei nicht-reduzierenden Bedingungen die größere der beiden Bande ein stärkeres Signal lieferte. Diese Verschiebung des Molekulargewichtes könnte dadurch zustande kommen, dass unter nicht-reduzierenden Bedingungen die Tertiärstruktur von ChR2 durch eine oder mehrere Disulfidbindungen zwischen den Cysteinen eines ChR2-Proteins stabilisiert wird. Die Konformation eines solchen ChR2-Protein würde im Vergleich zum durch  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziertem ChR2-Protein eine größere räumliche Ausdehnung besitzen und somit nach Auftrennung im SDS-Gel auch ein etwas größeres Molekulargewicht aufweisen.



**Abbildung 4.2. Vergleich der Sekundärstruktur von ChR1 und ChR2.** **a** Vergleich der Aminosäuresequenz von ChR1 und ChR2 im Bereich der Transmembranregion (nach Nagel et al., 2005). Identische Aminosäuren sind blau und Cystein-Reste rot markiert. Die sieben hypothetischen Transmembranhelices sind grau hinterlegt. **b** und **c** Schema der Sekundärstruktur von ChR1 und ChR2 auf Grundlage der Information aus **a**. Cysteine sind rot markiert und Transmembranhelices durch grüne (ChR1) bzw. blaue (ChR2) Zylinder symbolisiert. Die N- und C-terminalen Aminosäuren wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen. Die Zahlen geben die jeweilige Aminosäureposition an. NT: N-Terminus. CT: C-Terminus. Der Pfeil in **a** und **b** markiert das für eine Disulfidbindung in Frage kommende Cystein im ChR1-Protein. Das Retinal-bindende Lysin in Helix 7 ist gelb hinterlegt. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben.

Zur Klärung der Frage nach dem Proteinpartner von ChR1 stellt die Immunopräzipitation die Methode der Wahl dar. Dabei kann das ChR1-Dimer durch Bindung an den in dieser Arbeit hergestellten spezifischen anti-ChR1-Antikörper aus einem Zellextrakt unter nativen Bedingungen präzipitiert und dadurch gereinigt werden, so dass schließlich der Proteinpartner von ChR1 analysiert werden kann.



Dies könnte weitere Erkenntnisse zur Aufklärung der molekularen Abläufe in der Photorezeption von *C. reinhardtii* liefern.

#### **4.5 Gründe für die geringe Motilität der ChR1-RNAi-Transformanten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ChR1-RNAi-Mutanten unter Verwendung der zwei Plasmide pAS-CSOA und pPB-ASChR1 erzeugt, wobei mit dem Plasmid pAS-CSOA eine auffällig hohe Anzahl an nicht schwimmfähigen Transformanten erhalten wurde (siehe Kapitel 3.6.1). In *C. reinhardtii* wird die in den Zellkern mittels Transformation eingebrachte DNA über nicht-homologe Rekombination in eine beliebige Stelle im Genom integriert (Gumpel et al., 1994). Findet diese Integration in ein codierendes Gen statt, so wird der offene Leserahmen des betreffenden Gens zerstört, was zu einem Ausfall der Expression des entsprechenden Proteins führt. Am Aufbau und der Funktion der Flagellen in *C. reinhardtii* sind über 200 Genprodukte beteiligt (Piperno et al., 1981; Dutcher, 1995), deren Ausfall zu verschiedenen Motilitätsdefekten führen kann. Mittels Insertionsmutagenese konnten Tam & Levebvre 1993 zeigen, dass nach Transformation eines Selektionsmarkers etwa 2,5 Prozent der Transformanten Motilitätsdefekte auf Grund der Integration der transformierenden DNA in ein Flagellen-Gen aufwiesen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Transformationsexperimenten mit dem Plasmiden pAS-CSOA (siehe Kapitel 3.6) lag die Rate von nicht schwimmfähigen Transformanten bei etwa 60 Prozent, so dass dies nicht allein auf eine Insertionsmutagenese zurückgeführt werden kann. Eine Ursache könnte in dem für die Selektion von Transformanten verwendeten Antibiotika Zeocin liegen. Das Plasmid pAS-CSOA enthielt als Selektionsmarker das Phleomycin-Gen unter der Kontrolle des homologen *rbcS2*-Promotors (Stevens et al., 1996). Der Nachteil dieses Selektionsmarkers besteht womöglich darin, dass die Wirkung von Zeocin auf der Degradation der DNA beruht (Stevens et al., 1996), und die Resistenz durch ein das Aminoglykosid bindendes Protein (Phleomycin-Protein) vermittelt wird. Sollten während der Selektion der Transformanten nicht alle Zeocin-Moleküle durch Bindung an ein Phleomycin-Protein inaktiviert werden, so könnten diese im Zellkern ihre mutagene Wirkung entfalten. Da *C. reinhardtii* bekanntlich eine große Anzahl von Genen besitzt, die am Aufbau und der Funktion der Flagellen beteiligt sind (Piperno et al., 1981; Dutcher, 1995), könnten diese Gene gehäuft von solchen durch Zeocin hervorgerufenen Mutationen betroffen sein, wodurch die hohe

Anzahl von immotilen Transformanten mit dem Plasmid pAS-CSOA erklärt werden könnte. Im Unterschied dazu wurde bei der Transformation mit dem Plasmid pPB-ASChR1 ein modifiziertes *aph7*-Gen (Berthold et al., 2002) verwendet, welches für eine Phosphotransferase codiert, die durch Phosphorylierung das Aminoglykosid-Antibiotikum Hygromycin B inaktiviert und so die Resistenz vermittelt. Die antibiotische Wirkung von Hygromycin B beruht auf der Inhibierung der Proteinbiosynthese und führt nicht zu einer Schädigung der DNA, so dass mit diesem Transformationssystem keine zusätzlichen Mutationen entstehen können. Dies spiegelte sich in der deutlich geringeren Anzahl von immotilen Transformanten mit dem Plasmid pPB-ASChR1 wieder (siehe Kapitel 3.6.2).

#### **4.6 ChR1 steuert Phototaxis und photophobische Antwort**

Für die Analyse der Beteiligung von ChR1 an den lichtinduzierten Bewegungsreaktionen von *C. reinhardtii* konnte die in dieser Arbeit generierte RNAi-Transformante H-17 verwendet werden. Diese Mutante zeichnete sich durch eine uneingeschränkte Motilität und eine, vor allem in Gameten, sehr starke Reduktion des ChR1-Gehaltes aus. Während vegetative Zellen noch etwa 50 % des ursprünglichen ChR1-Gehaltes aufwiesen, enthielten die Gameten dieser RNAi-Mutante nur noch ein bis zwei Prozent an ChR1-Protein. Die unterschiedliche Menge an ChR1 spiegelte sich in der Reaktion dieser Mutante auf Licht wieder. Das Fehlen des ChR1-Proteins in Gameten führte zum vollständigen Verlust der Phototaxis (Abbildung 3.22 b), der phototaktischen Orientierung (Abbildung 3.25 a) sowie der photophobischen Reaktion (Abbildung 3.23 b). Die noch vorhandene Restmenge an ChR1 von etwa 50 Prozent in vegetativen Zellen reichte offensichtlich noch aus, dass diese Zellen eine photophobische Reaktion nach Applikation eines sättigenden Lichtblitzes ausführen konnten (Abbildung 3.23 d). Allerdings führte die Reduktion zur deutlichen Abschwächung der phototaktischen Orientierung (Abbildung 3.25 b) und zum vollständigen Verlust der Phototaxis während des Beobachtungszeitraumes von acht Minuten (Abbildung 3.22 a).

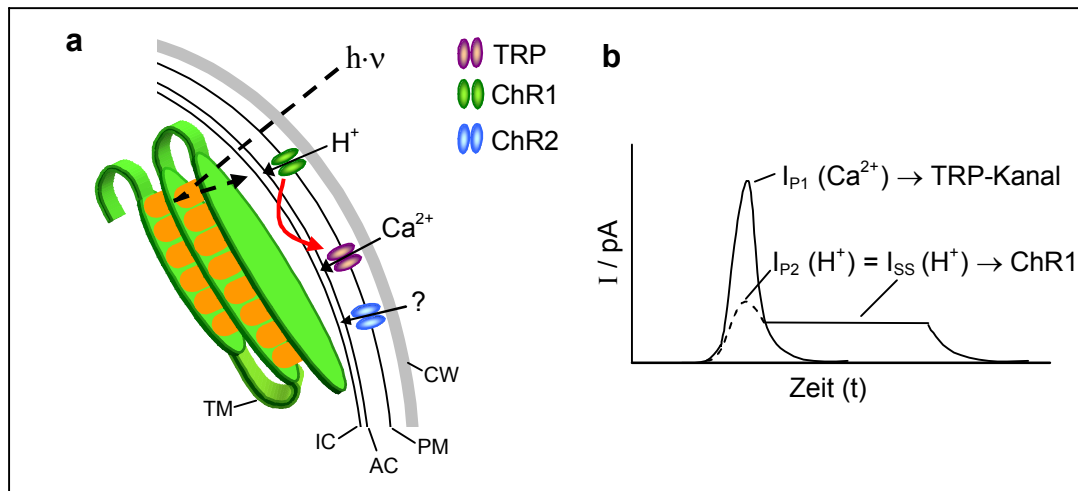
Diese Ergebnisse zeigten eindeutig die Funktion von ChR1, als Photorezeptor für die Phototaxis und die photophobische Reaktion. In der Arbeit von Govorunova et al. (2004) wurde ebenfalls eine RNAi-Mutante mit stark reduziertem ChR1-Gehalt untersucht. Diese A22 genannte Mutante zeigte im Vergleich zur Kontrolle nur bei

niedrigen Lichtintensitäten eine schwache Reduktion der photophobischen Antwort, während bei sättigenden Lichtpulsen kein Unterschied festgestellt werden konnte. Ein sehr wichtiger Punkt bei der Analyse von RNAi-Mutanten ist die Tatsache, dass die Expression des ins Genom integrierte RNAi-Konstrukts selbst durch *Silencing* abgeschaltet werden kann, und somit der RNAi-Phänotyp, also die Reduktion der Expression des entsprechenden Gens, verloren geht (Rohr et al., 2004). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit parallel zu den physiologischen Analysen der ChR1-Gehalt der verwendeten Zellen bestimmt, um einen direkten Zusammenhang zwischen Chop1-Gehalt und der physiologischen Reaktion herstellen und ein mögliches Abschalten der Expression des RNAi-Konstruktes erkennen zu können. Da dieser direkte Zusammenhang aus der Arbeit von Govorunova et al. (2004) nicht hervorgeht, könnte die eher geringe Reduktion der photophobischen Reaktion im Vergleich zur starken Reduktion des ChR1-Gehalts der Mutante A22 auf einem Verlust des RNAi-Phänotyps zum Zeitpunkt der Bewegungsanalyse beruhen.

### 4.7 ChR1 beeinflusst die Photoströme

Die elektrophysiologischen Messungen an den in dieser Arbeit generierten ChR1-RNAi-Mutanten zeigten, dass die Reduktion der Expression von ChR1 eine Verminderung der Amplitude des stationären Stroms  $I_{SS}$  und des Augenstroms  $I_{P1}$  zur Folge hatte (siehe Kapitel 3.7.5). Am deutlichsten war dies an der Mutante H-17 zu beobachten. Während in vegetativen Zellen dieser Mutante, bei denen ChR1 auf etwa 50 % der ursprünglichen Menge reduziert war,  $I_{SS}$  und  $I_{P1}$  eine verminderte Amplitude aufwiesen, konnten an Gameten, die nur noch ein bis zwei Prozent der ursprünglichen ChR1-Menge enthielten,  $I_{SS}$  und  $I_{P1}$  nicht mehr abgeleitet werden. Dies zeigte deutlich, dass sowohl der stationäre Protonenstrom  $I_{SS}$  als auch der transiente Photorezeptorstrom  $I_{P1}$  vom Vorhandensein des ChR1-Proteins abhängen. Da es sich jedoch bei ChR1 um einen lichtgesteuerten Protonenkanal handelt (Nagel et al., 2002), kann ChR1 nicht für den Photorezeptorstrom  $I_{P1}$  verantwortlich sein, da dieser Strom Kalzium-abhängig ist (Holland et al., 1996). Wie Messungen mit Lichtpulsen und einer Protonenkonzentration von pH 4 zeigten, handelte es sich bei dem Strom  $I_{SS}$  um einen Protonenstrom (Ehlenbeck et al., 2002), der bei pH 6.8 eine sehr kleine Amplitude von etwa 1-2 pA besitzt (Abbildung 3.26 a und Ehlenbeck et

al., 2002). Bei pH 4 hingegen vergrößert sich die Amplitude von  $I_{SS}$  auf etwa 7 pA (Ehlenbeck et al., 2002) und ist unter diesen Bedingungen vom Hintergrundrauschen der Messung, das bei etwa 1 pA liegt, deutlich zu unterscheiden. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten, führt dies zwangsläufig zu der Annahme, dass ChR1 der Ionenkanal für den Protonenstrom  $I_{SS}$  ist, durch den spannungsabhängige sekundäre Kalziumkanäle aktiviert werden, die schließlich den Augenstrom  $I_{P1}$  hervorrufen (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3. Der Augenfleck und die Generierung der Photorezeptorströme.**  
**a** Aufbau des Augenflecks und Lage der Photorezeptoren ChR1 und ChR2 sowie des postulierten TRP-Kanals. Der TRP-Kanal wird durch die von ChR1 hervorgerufene Depolarisierung nach einem Lichtstimulus (gestrichelter Pfeil) aktiviert (roter Pfeil). **b** Modell der lichtinduzierten Ströme  $I_{P1}$ ,  $I_{P2}$  und  $I_{SS}$  bei pH 6.8. *Channelrhodopsin 1* erzeugt den primären lichtinduzierten Protonenstrom  $I_{P2}$  der in den stationären Strom  $I_{SS}$  übergeht, wodurch ein spannungsabhängiger TRP-Kanal aktiviert wird, der den Kalziumstrom  $I_{P1}$  generiert.

Dabei kommt es zu einer Signalverstärkung, da durch die lokale Depolarisation der Zellmembran oder durch den lokal veränderten pH-Wert im Bereich des Augenflecks eine Vielzahl von TRP-Kanälen geöffnet werden. Vor kurzem konnte in dieser Arbeitsgruppe ein Ionenkanal in *C. reinhardtii* identifiziert werden, der zur Familie der *transient potential receptor* (TRP)-Kanäle zählt (Stanimir Dulev, persönliche Mitteilung). Diese Proteinsuperfamilie wurde 1977 in einer Phototransduktionsmutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Minke, 1977) und beinhaltet mittlerweile eine große Anzahl verschiedener Kationenkanäle, die an sensorischen Prozessen wie der visuellen Wahrnehmung sowie der Mechano- und Chemorezeption beteiligt sind (Moran et al., 2004). Ob es sich hierbei um den

Ionenkanal für den Kalzium-abhängigen Photorezeptorstrom  $I_{P1}$  handelt ist noch nicht geklärt. Allerdings unterstützt die Entdeckung dieses TRP-Kanals die Hypothese, dass es sich bei  $I_{P1}$  um einen durch den Protonenstrom  $I_{SS}$  ausgelösten sekundären Strom handelt. Zur Klärung dieser Frage wäre es notwendig, Mutanten mittels der RNAi-Technik zu generieren, bei denen die Expression dieses TRP-Kanals stillgelegt ist. In solchen Mutanten sollte dann nur noch der stationäre Protonenstrom  $I_{SS}$  messbar sein.

#### **4.8 Lokalisation von ChR1 und ChR2 im Bereich des Augenflecks**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunofluoreszenz-Analysen ergaben, dass ChR1 in einem eng begrenzten, fast punktförmigen posterioren Bereich in der Nähe des Zelläquators lokalisiert ist (siehe Kapitel 3.8.1). Wie elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gruber & Rosario (1974) zeigten, war auch hier der Augenfleck posterior in der Nähe des Zelläquators lokalisiert, so dass die Lokalisation der beiden Channelrhodopsine sehr gut mit der des Augenflecks übereinstimmt. Da bei der für die Immunofluoreszenz-Analysen verwendeten Präparationsmethode vor allem das Zytoskelett und die damit assoziierten Proteine fixiert wurden, während alle übrigen Zellbestandteile verloren gingen, zeigte die Lokalisation von ChR1 in einem eng begrenzten Bereich, dass diese auf einer Wechselwirkung mit Komponenten des Zytoskeletts beruhen musste, was zu einer Verankerung der Photorezeptorproteine in der Zellmembran über dem Augenfleck führen sollte. In der Arbeit von Ehlenbeck et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass der lichtinduzierbare Protonenstrom im Bereich des Augenflecks lokalisiert ist, da das Vorzeichen der gemessenen Stromamplitude davon abhing, ob sich der Augenfleck während der Messung innerhalb (negative Amplitude) oder außerhalb (positive Amplitude) der Messpipette befand. Aufgrund der gemeinsamen Lokalisation von ChR1 und des Protonenstroms im Bereich des Augenflecks von *C. reinhardtii* kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei ChR1 um den lichtgesteuerten Ionenkanal für den Protonenstrom  $I_{SS}$  handelt. Die in dieser Arbeit durchgeführte Immunolokalisation von ChR1 steht ferner im Einklang mit den Ergebnissen von Suzuki et al. (2003). Allerdings war durch die Kolokalisation mit  $\alpha$ -Tubulin sowie durch den Einsatz der konfokalen Mikroskopie eine bessere Einordnung der ChR1-Signale in den zellulären Kontext möglich.

Die Immunolokalisation von ChR2 (siehe Kapitel 3.8.2) lieferte ähnliche Ergebnisse wie bei ChR1. Der anti-ChR2-Antikörper lieferte ein eng begrenztes Signal im Bereich des Augenflecks, wobei die Intensität des Signals in Gameten sehr viel stärker war als in vegetativen Zellen. Allerdings ist die Interpretation dieser Lokalisationen schwierig, da der verwendete anti-ChR2-Antikörper bekanntlich sehr stark mit dem ChR1-Protein kreuzreagieren kann (siehe Kapitel 3.5.1). Dadurch bleibt unklar, in wieweit es sich bei diesen Signalen um das ChR2-Protein handelt, oder ob der anti-ChR2-Antikörper hier auch das ChR1-Protein erkannte.

#### **4.9 Mögliche Funktion von *Channelrhodopsin 2***

Während im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von *Channelrhodopsin 1* als Photorezeptor für die phototaktische und photophobische Reaktion weitgehend aufgeklärt werden konnte, bleibt die Rolle von *Channelrhodopsin 2* bezüglich der Photorezeption und der Generierung der lichtinduzierten Ströme in *C. reinhardtii* weiterhin unklar. Die Expression in *Xenopus*-Oozyten ergab, dass es sich bei ChR2 um einen lichtgesteuerten Ionenkanal handelt, der eine Leitfähigkeit für Kationen besitzt, wobei die Leitfähigkeit mit steigendem Hydratationsradius abnimmt ( $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$ ; Nagel et al., 2003). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, enthalten cw2-Gameten natürlicherweise nur etwa 10 % der ChR2-Menge von vegetativen Zellen. Aus diesem Grund kann ChR2 bei der Generierung der bisher an Einzelzellen gemessenen Photorezeptorströmen keine entscheidende Rolle gespielt haben, da alle bis heute vorhandenen elektrophysiologischen Daten bezüglich der lichtinduzierten Ströme auf Saugelektrodenmessungen an Gameten der Zellwandmutante cw2 beruhen. Der Unterschied in der ChR2-Expression verschiedener Stämme ist insbesondere für die Interpretation und den Vergleich der bisher an *C. reinhardtii* gemessenen Aktionsspektren der Phototaxis und der photophobische Reaktion sowie für die Interpretation der Funktion von ChR2 von großer Bedeutung. Während die Phototaxis-Aktionsspektren von Nultsch et al. (1971) und Sineshchekov et al. (2002) je ein Maximum bei etwa 450 nm und 500 nm zeigten, besaßen die Aktionsspektren von Foster et al. (1984) nur ein Maximum bei etwa 500 nm. Auch das von Uhl & Hegemann (1990) gemessene Aktionsspektrum der photophobischen Reaktion wies nur ein Maximum bei 500 nm auf. Alle genannten Arbeitsgruppen verwendeten für die Erstellung der Aktionsspektren

unterschiedliche *C. reinhardtii*-Stämme, so dass das Fehlen des Maximums bei etwa 450 nm in den Spektren von Foster et al. (1984) und Uhl & Hegemann (1990) unter Umständen auf eine reduzierte ChR2-Expression in den verwendeten Stämmen zurückgeführt werden könnte. Aus diesem Grund wäre es notwendig, in allen bisher verwendeten Stämmen die Expression von ChR2 zu untersuchen.

Für die Klärung der Frage, welche Rolle ChR2 bei der Photorezeption von *C. reinhardtii* spielt, könnten RNAi-Mutanten mit reduziertem ChR2-Gehalt verwendet werden. Aufgrund des natürlich geringen ChR2-Gehalts von Gameten der Zellwandmutante *cw2* (siehe Kapitel 3.5.1), ist dieser Stamm für die Funktionsanalyse von ChR2 mittels der RNAi-Technik nur bedingt geeignet. Ein alternativer Ansatz wäre, ChR2 in der im Rahmen dieser Arbeit generierten ChR1-Mutante H-17 unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors überzuexprimieren. Gameten dieser neu generierten Mutante würden dann nur das ChR2-Protein exprimieren, während die Expression des ChR1-Protein abgeschaltet ist. An einer solchen Mutante könnte man schließlich untersuchen, welche Rolle ChR2 bei der Generierung der lichtabhängigen Photoströme und bei den lichtinduzierten Bewegungsantworten spielt.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Organismen und Plasmide

##### *Escherichia coli*

Stamm	Eigenschaften	Quelle
<i>BL21(DE3)</i>	F <sup>-</sup> , ompT, hsdSB (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ), gal, dcm (DE3)	Studier et al., 1990
<i>DH10B</i>	mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ80d, lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araΔ139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK, rspL, nupG{p3:Km, amber amp, amber tet}	Grant et al., 1990

##### *Chlamydomonas reinhardtii*

Stamm	Eigenschaften	Quelle
<i>CC-124mt<sup>-</sup></i>	Wildtypstamm (R.P. Levine via N.W. Gillham, 1968)	<i>Chlamydomonas</i> Genetics Centre, Duke University Durham, NC, USA
<i>CC-620mt<sup>+</sup></i>	Wildtypstamm zur Autolysin-Präparation	
<i>CC-621mt<sup>-</sup></i>	Wildtypstamm zur Autolysin-Präparation	
<i>CC-1731</i>	Zellwandmutante <i>cw2</i>	

##### Plasmide

Plasmid	Eigenschaften/Funktion	Quelle
pMalp2x	Expression von MBP-Fusionsproteinen	New England Biolabs
ChR1 <sub>As310-712</sub>	ChR1-Expression von AS 310 – 712 in pET21-a <sup>+</sup> -Vektor	Dr. Suneel Kateriya
ChR2 <sub>As272-723</sub>	ChR2-Expression von AS 310 – 712 in pET21-a <sup>+</sup> -Vektor	Dr. Suneel Kateriya
pHyg3	Hygromycin B Resistenz-Marker für <i>C. reinhardtii</i>	Berthold et al., 2002
pAS-CSOA	Plasmid mit ChR1-RNAi-Konstrukt und Phleomycin-Marker (ble)	Sineshchekov et al., 2002
pXX15A	ChR1-RNAi-Konstrukt	Dr. Suneel Kateriya



### 5.1.2 Biochemikalien

β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe, BRD)
Agarose	PeqLab (Erlangen, BRD)
Amylose-Säulenmaterial	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Antibiotika	Invitrogen (Karlsruhe, BRD)
BAPTA	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Enzyme für molekularbiologisches Arbeiten	Fermentas (Vilnius, Litauen) New England Biolabs (Beverly, USA)
Fluoreszenzmarkierte Antikörper	Invitrogen (Karlsruhe, BRD)
IPTG	Roth (Karlsruhe, BRD)
Kits für molekularbiologisches Arbeiten	Macherey und Nagel (Oensingen, Schweiz) Qiagen (Hilden, BRD)
Medien (Bacto-Trypton, Yeast-Extract)	Difco (Detroit, USA)
Milchpulver	Merck (Darmstadt, BRD)
Ni-NTA-Agarose	QIAGEN (Hilden, BRD)
Protease-Inhibitor	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Salze	Merck (Darmstadt, BRD) Sigma (Deisenhofen, BRD)
SDS	Sigma (Deisenhofen, BRD)
sekundärer Antikörper	Amersham (Piscataway, USA)
Tween20	Roth (Karlsruhe, BRD)

## 5.2 Kultur von *Chlamydomonas reinhardtii*

### 5.2.1 Kultivierung vegetativer Zellen

Vegetative Zellen wurden in einem Hochsalzmedium mit Acetat (HSA-Medium) nach Sueoka et al. (1967) im Dauerlicht (70W/m<sup>2</sup>, 25°C) unter Schütteln (120 Upm) kultiviert. Bei der Kultivierung der zellwand-defizienten *C. reinhardtii* Mutante *cw2* wird dem Medium Sorbitol zugesetzt. Sorbitol kann von *C. reinhardtii* nicht aufgenommen werden (Peter Hegemann, persönliche Mitteilung) erhöht aber die Osmolarität des Mediums. Dadurch soll ein Selektionsdruck auf eine Reversion der Zellwandmutation verhindert werden. Ohne Sorbitol kann vermehrt Wasser in die zellwand-defizienten Zellen eindringen, das unter erhöhtem Energieverbrauch über die kontraktive Vakuole aus der Zelle gepumpt werden muss. Revertanten hätten aufgrund des geringeren Energiebedarfs womöglich einen Selektionsvorteil, so dass nach einigen Generationen diese Mutation verloren gehen könnte. Bei der Arbeit mit dem *cw2*-Stamm wurde, wenn nicht anders beschrieben, dem HSA-Medium standardmäßig 250mM Sorbitol zugesetzt.

#### HSA-Medium:

6,2 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
6,8 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
81 µM	MgSO <sub>4</sub>
100 µM	CaCl <sub>2</sub>
9,3 mM	NH <sub>4</sub> Cl
15 mM	NaOAc
250 mM	Sorbitol (nur bei <i>cw2</i> )
0,9%	Agar- Agar
0,1%	Spurenelementlösung

#### Spurenelemente (Hutner et al., 1950):

22,0 g	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
11,4g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
5,1 g	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O
5,0 g	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
1,6 g	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O
1,6 g	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O
1,1 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
50,0 g	EDTA

Der pH-Wert des Mediums lag zwischen 6,8 und 6,9 bei RT.

### 5.2.2 Kultur von vegetativen Zellen in 24-Well- bzw. 6-Well-Platten

Die gleichzeitige Anzucht vieler unterschiedlicher Transformanten zur Identifizierung von RNAi-Transformanten erfolgte in 24-Well bzw. 6-Well-Platten (Fa. Nunc GmbH, Wiesbaden, BRD) in HSA-Medium, wobei als Kulturvolumen 2 ml (24-Well) bzw. 7 ml (6-Well) verwendet wurden. Die Inkubation erfolgte im Dauerlicht mit einer Lichtintensität von 70 W/m<sup>2</sup> bei 25 °C und 120 UpM.

### 5.2.3 Differenzierung von vegetativen Zellen zu Gameten

Die Differenzierung von vegetativen Zellen zu Gameten erfolgte in stickstofffreien NMM-Medium (Foster et al., 1984) unter Dauerlicht (70W/m<sup>2</sup>, 25 °C, 120 Upm). Dazu wurde eine sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Kultur von vegetativen Zellen (OD<sub>800</sub> = 0.3 – 0.7) durch Zentrifugation bei 900 g geerntet, in NMM-Puffer resuspendiert und für 24 h im Dauerlicht (70 W/m<sup>2</sup>, 25 °C, 120 Upm) inkubiert.

#### **NMM-Medium (Foster et al., 1984):**

3,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

3,1 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

81 µMMgSO<sub>4</sub>

100 µM CaCl<sub>2</sub>

Der pH-Wert des NMM-Mediums lag zwischen 6,8 und 6,9 bei RT.

### 5.3 Transformation von *C. reinhardtii*

Die Transformation der *C. reinhardtii* Zellwandmutante *cw2* wurde modifiziert nach der Glasperlenmethode von Kindle (1990) durchgeführt. Die Algenzellen wurden in HSA-Medium mit 250 mM Sorbitol im Dauerlicht (70W/m<sup>2</sup>, 25 °C, 120 UpM) angezogen, während der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation bei

max. 900 g geerntet und in HSA-Medium mit Sorbitol zu einer Konzentration von  $3 \cdot 10^8$  Zellen/ml resuspendiert. Für die Transformationsreaktion wurden 330 µl der Zellsuspension ( $\approx 1 \cdot 10^8$  Zellen) mit 0,3 g sterilen Glasperlen ( $\varnothing$  0,45 mm) und 1,5 µg Plasmid-DNA in einem 2 ml ERG gemischt und für genau 15 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit auf einem Vortex-Gerät (Heidolph Vortex, Typ 54117, 2400 UpM) behandelt. Anschließend erfolgte eine so genannte *phänotypische Expression*, die transformierten Zellen die Möglichkeit gab, den Resistenzmarker in ausreichender Menge zu exprimieren, bevor sie der Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgesetzt wurden. Dazu wurde der Transformationsansatz in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml HSA-Medium mit Sorbitol überführt und für 20 Stunden im Dauerlicht (70W/m<sup>2</sup>, 25°C, 120 UpM) inkubiert. Zur Selektion von Transformanten wurden die Zellen durch Zentrifugation (900 g, 25°C) geerntet, in 500 µl HSA-Medium mit Sorbitol resuspendiert und auf je zwei HSA-Platten mit Sorbitol dem entsprechenden Antibiotikum plattiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation unter Dauerlicht (70W/m<sup>2</sup>, 25 °C) wobei nach 7 bis 15 Tagen Kolonien von Transformanten sichtbar wurden.

### 5.4 Präparation von Gameten-Autolysin

Zum Verdau der Zellwand des Wildtyp-Stammes *CC124mt<sup>-</sup>* für die Immunofluoreszenzanalyse wurde das lytische Enzym *Autolysin* von Gameten verwendet, welches die Zellwand abbaut. Die Präparation von Autolysin erfolgte ausgehend von den beiden *C. reinhardtii*-Stämmen *CC-620* und *CC-621* die jeweils einen unterschiedlichen Paarungstyp aufweisen. Dazu wurde zunächst eine Vorkultur der beiden Stämme in 250 ml HSA-Medium bis zu einer Dichte von ca.  $3 - 8 \cdot 10^6$  Zellen/ml unter Dauerlicht angezogen. Nach Ernte der Zellen (Beckmann JA10-Rotor, 2200 Upm, 10 min, RT) und einmaligem Waschen mit ca. 50 ml NMM-Medium wurden diese in 1 l NMM Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben resuspendiert und 24 h im Dauerlicht unter Schütteln inkubiert. Hierauf wurden die Zellen erneut geerntet (Beckmann Ja10-Rotor, 2200 Upm, 10 min, RT) und in 200 ml TAP-N-Medium resuspendiert. Zur Bildung des Gameten-Autolysins wurden die beiden Stämme gemischt und für 2 h im Dauerlicht (70 W/m<sup>2</sup>) ohne Schütteln inkubiert. Das von den Gameten in das Medium ausgeschiedene Autolysin wurde

durch eine erste Zentrifugation (Beckmann 25.50-Rotor, 6.000 Upm, 5min, RT) von den Zellen abgetrennt und durch eine weitere Zentrifugation (Beckmann 25.50-Rotor, 20.000 Upm, 5min, RT) weiter aufgereinigt. Schließlich wurde der Überstand steril filtriert (0,45 µM) und bei –70 °C aufbewahrt.

## 5.5 Molekularbiologische Methoden

### 5.5.1 Bakterienkultur

Zur Klonierung von Genkonstrukten wurde ausschließlich der *Escherichia coli* Stamm DH10B und für die heterologe Proteinexpression der Stamm BL21 verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in LB- oder 2x YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin unter Schütteln (180 UpM) oder auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin. Für die Langzeitlagerung wurden Glycerin-Kulturen angelegt. Dazu wurden 5 ml einer frischen Bakterienkultur in der stationären Wachstumsphase geerntet und die Zellen in 1 ml LB-Medium resuspendiert und mit 2 ml sterilem 87%igem Glycerin gemischt. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -21 °C.

	LB-Medium	2x YT-Medium
Trypton	10 g	16 g
Hefeextrakt	5 g	10 g
NaCl	10 g	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1l	
Bacto-Agar	9 g	

### 5.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* im Rahmen der Klonierung von DNA-Konstrukten wurde das *NucleoSpin®-Plasmid* Kit (Fa. Macherey-Nagel, Düren, BRD) verwendet und gemäß der Vorschrift des Herstellers verfahren. Größere Mengen an Plasmid DNA für die Transformation von *C. reinhardtii* wurden mit Hilfe des

*NucleoBond® PC-100 Kits* (Fa. Macherey-Nagel, Düren, BRD) nach der Vorschrift des Herstellers aus *E. coli* gereinigt.

### **5.5.3 Gelelektrophorese von DNA**

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in 1-2%igen Agarosegelen in TAE-Puffer mit 0,5 mg/l Ethidiumbromid (Sambrook & Russel, 2001). Die Proben wurden mit 0,2 Volumenanteilen 6x DNA-Probenpuffer versetzt und bei maximal 5 V/cm Elektrodenabstand getrennt. Die Detektion der DNA erfolgte durch UV-Licht induzierte Fluoreszenz bei 254 nm und 306 nm. Die Ergebnisse einer Elektrophorese wurden auf einem Geldokumentationsystem mit UV-Durchlicht und Thermodrucker der Fa. Vilber („Vilber Lourmat“ mit „Bio 1D“-Software, Version 5.01) festgehalten.

### **5.5.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen und Lösungen**

Für die Reinigung von DNA-Molekülen aus Agarose-Gelen und Lösungen wurde das *NucleoSpin® Gel Extraction Kit* (Fa. Macherey-Nagel) verwendet und gemäß der Vorschrift des Herstellers verfahren.

### **5.5.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Für die PCR-Amplifikation von DNA wurde der PCR-Thermocycler *T-Gradient* (Fa. Biometra, Göttingen) verwendet. Die Reaktionen erfolgten in sterilen, dünnwandigen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen.

Die PCR-Reaktionsansätze wurden standardmäßig nach folgendem Schema angesetzt:

x µl	<i>template</i> -DNA
5 µl	10 x PCR-Puffer
10 µl	20 mM dNTPs (Fa. Fermentas)
10 µl	5M Betain
1 µl	Primer 1 (50 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (50 pmol/µl)
0,5 µl	<i>Vent</i> -Polymerase (0,5 U/µl)
ad 50 µl	mit ddH <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>

Bei jeder PCR-Reaktion wurde zusätzlich ein Ansatz ohne DNA (Wasserkontrolle) verwendet, um Kontaminationen einzelner PCR-Lösungen und somit falsch-positive Banden in der PCR erkennen zu können.

Als Enzym diente die *Vent*-DNA-Polymerase des Herstellers New England Biolabs. Wegen des hohen GC-Gehaltes des Genoms von *C. reinhardtii* wurde die Amplifikation in Gegenwart von 1 M Betain durchgeführt. Die Ansätze wurden zunächst auf Eis vorbereitet und dann sofort in den vorgeheizten Block des Thermocyclers gestellt (*hot start*). Nach einer anfänglichen Denaturierung von 3 min erfolgte die Amplifikation unter folgenden Temperatur- und Zeitbedingungen:

95°C	1 min	<i>Denaturierung</i>
55-70°C	1 min	<i>Primer-annealing</i>
72°C	0,5-1,5 min	<i>Extension</i>
Anzahl	25-35	

Im Anschluss an das Programm erfolgte noch ein finale Extension bei 72°C für 5 min, um die vollständige Verlängerung partiell polymerisierter Produkte zu gewährleisten. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch analytische bzw. präparative Gelelektrophorese in einem Agarose-Gel.

## 5.5.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

### 5.5.6.1 Restriktionsverdau von DNA

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen wurde gemäß Sambrook & Russel (2001) durchgeführt.

### 5.5.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die *Fast-Link*<sup>™</sup> DNA-Ligase (Fa. Epicentre, Madison, WI, USA) verwendet. Dazu wurden ca. 200 ng Plasmidvektor und einem zweifacher molaren Überschuss an Insert-DNA in Gegenwart von 1 mM ATP und 2 U *Fast-Link*<sup>™</sup> DNA-Ligase in 1 x Reaktionspuffer gemischt, wobei das Gesamtvolumen 15 µl betrug. Anschließend erfolgte die Inkubation des Ansatzes für 5 min („sticky-ends“) bzw. 15 min („blunt-ends“) bei RT. Nachfolgend wurden kompetente *E. coli*-Zellen üblicherweise mit dem gesamten Ligations-Ansatz transformiert (siehe 5.5.6.3).

### 5.5.6.3 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte modifiziert nach Hanahan (1983). Zur Herstellung kompetenter *E. coli* DH10B-Zellen wurden 50 ml LB<sub>0</sub>-Medium mit einer frischen ÜK zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Nach 1 h Wachstum im Schüttelwasserbad bei 37°C wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 1 ml MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Nach weiteren 30 min Inkubation erreichten die Bakterien eine Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 und wurden daraufhin 2 h auf Eis gehalten. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 5000 Upm, 4°C, JA-25.50-Rotor, Beckmann) wurde das Zellpellet in 20 ml kaltem CMN-Puffer aufgenommen, eine weitere Stunde auf Eis inkubiert und nochmals abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 2 ml kaltem CMN-Puffer resuspendiert und ÜN bei 4°C gelagert. Abschließend wurde die Zellsuspension in Aliquots zu je 200 µl aufgeteilt und mit je 15 µl Glycerin versetzt. Die Lagerung erfolgte bei –70°C. Vor Verwendung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut.



Zur Transformation wurde Plasmid-DNA (10-100 ng) bzw. ein DNA-Ligationsansatz (siehe 5.5.6.1) zu einem 100µl-Aliquot kompetenter DH10B-Zellen gegeben. Hierauf folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis und anschließend ein Hitzeschritt für 5 min bei 37°C. Der Transformationsansatz wurde auf LB<sub>0</sub>-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C.

### **5.5.7 Expression und Reinigung von Proteinfragmenten aus *E. coli***

Für die heterologe Expression von Proteinfragmenten aus *C. reinhardtii* wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) verwendet. Die Proteinfragmente wurden entweder als Fusionsproteine mit dem Maltosebindeprotein (MBP) aus *E. coli* oder aber mit C-terminalem His-tag exprimiert.

#### **5.5.7.1 Reinigung des ChR1-MBP-Fusionsproteins**

Für die Expression des ChR2-MBP-Fusionsproteinen wurde das *pMal-System* der Firma New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) verwendet und im Wesentlichen nach den Angaben des Herstellers verfahren. Nach Induktion mit 1 mM IPTG im Falle von ChR1 und 0,4 mM IPTG bei ChR2 erfolgte die Expression für 3,5 Stunden bei 37°C in dYT-Medium (700 ml). Nach Ernte der Zellen wurden diese in 40 ml Säulenpuffer aufgenommen und mittels Lysozymbehandlung (100 µg/ml, 30 min, 30 °C) und anschließender Ultraschall Behandlung ("Sonifier Cell Disruptor B15", Fa. Branson, Stufe 5, 1 h im Eis-Wasser-Bad) aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt (45.000g, 1 h, 4 °C) wurden der Überstand mit den ChR-MBP-Fusionsproteinen nativ über eine Amylose-Säule gereinigt, wobei diese mit 700 ml Säulenpuffer gewaschen wurde (Flussrate: 1 ml/min). Die Elution erfolgte mit Säulenpuffer in Gegenwart von 10 mM Maltose. Das ChR1-Fragment wurde ÜN gegen 50mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7.2 bei 6 °C dialysiert. Da unter diesen Bedingungen eine große Menge des ChR2-Proteinfragments ausfiel, wurde in diesem Fall die Dialyse gegen 50 mM Glycin pH 9.0 wiederholt. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Fa. Millipore, Billerica, MA, USA) und einer Membran mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa. Die Proteinlösungen wurden bei -21 °C aufbewahrt.

**Säulenpuffer:** 20 mM Tris/HCl pH 7,5  
0,2 mM NaCl  
1 mM EDTA  
10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
Protease-Inhibitoren: 0,2  $\mu$ M Aprotinin, 0,1  $\mu$ M Pepstatin,  
0,1  $\mu$ M Leupeptin

#### 5.5.7.2 Reinigung von Proteinfragmenten aus *inclusion bodies*

Zur Reinigung von nach der Expression in *inclusion bodies* vorliegenden Proteinfragmenten wurden zunächst die *inclusion bodies* isoliert und anschließend durch Harnstoff aufgelöst. Dazu wurden die *E. coli*-Zellen nach der Expression in 700 ml 2x YT-Medium geerntet, in 40 ml eines Lysozym-haltigen Puffer (50 mM Tris, 0,1 % Triton X-100, 10  $\mu$ g/ml Lysozym, 0,2  $\mu$ M Aprotinin, 0,1  $\mu$ M Pepstatin, 0,1  $\mu$ M Leupeptin) resuspendiert und 20 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (Beckmann JA-25.50, 10000 UpM, 15 min , 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet (*inclusion bodies*) zweimal mit 50 mM Tris (pH 8,0) und anschließend viermal mit 50 mM Tris (pH 8,0) + 0,5 % Triton X-100 gewaschen. Schließlich wurden die *inclusion bodies* in 5 ml eines Denaturierungspuffers (50 mM Tris (pH 8,0), 8 M Harnstoff) resuspendiert und mittels Ultraschall (Sonifier Cell Disruptor B15", Fa. Branson, Stufe 5, 1 sec Pulse) aufgelöst. Die Proteinlösung wurde noch einmal abzentrifugiert (Beckmann JA-25.50, 10000 UpM, 15 min , 4 °C) und der Überstand mittels SDS-Page analysiert. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Fa. Millipore, Billerica, MA, USA) und einer Membran mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa. Die Proteinlösungen wurden bei -21 °C aufbewahrt. Die denaturierte Proteinlösung wurde bei -21 °C aufbewahrt.

#### 5.5.7.3 Proteinfragmente mit C-terminalem His-tag

Die Reinigung von Proteinfragmenten mit C-terminalem His-tag erfolgte im wesentlichen gemäß des *QIAGEN Expressionist* Handbuchs (Fa. QIAGEN, Hilden, BRD) mittels Ni-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen im Batch-Verfahren. Die Expression erfolgte in 700 ml *E. coli*-Kultur ml 2x YT-Medium. Die Induktion der Expression wurde in Gegenwart von 0,5 mM IPTG für 3,5 h bei 37 °C durchgeführt. Nach Ernte der Zellen wurde diese in 40 ml Puffer B aufgenommen

und die Zellen zusätzlich mit Ultraschall (Sonifier Cell Disruptor B15", Fa. Branson, Stufe 5, 5 min im Eis-Wasser-Bad) aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt (10.000 g, 30 min, RT) wurde der Überstand mit den Proteinfragmenten über eine Ni-NTA-Säule (10 ml Ni-NTA-Resin) gereinigt, wobei diese mit 200 ml Puffer C gewaschen wurde. Für die Elution der rekombinanten Proteine wurde die Harnstoff-Konzentration des Elutionspuffers E auf 2 M reduziert, um mit den Proteinlösungen direkt die Proteinbestimmung mittels BCA-Test durchführen zu können. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Fa. Millipore, Billerica, MA, USA) und einer Membran mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa. Die Proteinlösungen wurden bei -21 °C aufbewahrt.

**Puffer B:** 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM Tris·Cl  
8 M Harnstoff  
→ pH 8.0 mit NaOH

**Puffer C:** 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM Tris·Cl  
8 M Harnstoff  
→ pH 6.3 mit NaOH

**Elutionspuffer E:** 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM Tris·Cl  
2 M Harnstoff  
→ pH 4.5 mit HCl

### 5.5.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde mittels des BCA-Tests der Firma Pierce (Rochford, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Er basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu<sup>2+</sup> durch Proteine in alkalischem Medium zu Cu<sup>+</sup> reduziert wird. Verantwortlich für die Reaktion sind Cystein-, Cystin-, Tryptophan- und Tyrosin-Reste. Die Cu<sup>+</sup>-Ionen reagieren dann mit Bicinchoninsäure zu einem wasserlöslichen Komplex, der bei 562 nm absorbiert und somit eine quantitative Bestimmung von Protein durch Spektroskopie erlaubt. Die Eichgerade wurde mit einem BSA-Proteinstandard erstellt.

### **5.5.9 Herstellung von Membranfraktionen aus *C. reinhardtii* Zellextrakten**

Zur Abtrennung der löslichen Proteine von den unlöslichen Proteinen (Membranfraktion) wurden die entsprechende Menge an Zellen geerntet (800 g, 5 min, RT) und in 150 µl ME-Puffer (10 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 6.8) resuspendiert und 1 µl eines Protease-Inhibitor-Cocktails (Sigma 9599) zugegeben. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellen auf Eis mittels Ultraschall ("Sonifier Cell Disruptor B15", Fa. Branson, Stufe 2-3, 15 x 1 sec im Eis-Wasser-Bad, dazwischen 2 sec Pause). Hierauf wurde mittels Zentrifugation (2000 UpM, 5 min, 4 °C, Mikrozentrifuge) die durch den Aufschluss freigesetzte Stärke präzipitiert und der Überstand für 90 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde in ein neues 1,5 ml ERG überführt und mit 3-fach Probenpuffer nach Lämmli (Lämmli, 1970) versetzt. Das Pellet wurde direkt in 150 µl 1-fach Probenpuffer nach resuspendiert und beide Fraktionen für 5 min bei 95 °C inkubiert. Für die Westernblot-Analyse wurden 20 µl der jeweiligen Fraktion verwendet.

## **5.6 Immunologische Methoden**

### **5.6.1 Herstellung von polyklonalen Antiseren aus Kaninchen**

Die Herstellung der polyklonalen Antiseren in Kaninchen erfolgte bei der Firma Davids Biotechnology (Regensburg, BRD). Dazu wurden die exprimierten MBP-Fusionsproteinfragmente (siehe 5.5.7.1) mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml verwendet. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte über einen Zeitraum von 90 Tagen.

### **5.6.2 Affinitätsreinigung der Antikörper**

Um unspezifische Kreuzreaktionen von Kaninchen-Antikörpern mit Proteinen von *C. reinhardtii* zu verhindern, wurden die spezifischen ChR-Antikörper vor der Verwendung in Westernblot- und Immunofluoreszenz-Analysen mittels Affinitätsreinigung aus den polyklonalen Antiseren aufgereinigt. Dazu 200 µg der

über einen C-terminalen His-tag gereinigten Proteinfragmente (siehe 5.5.7.3) in einem 10%igen SDS-Gel augetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran mit dem Semi-Dry-Verfahren transferiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Farbstoff Ponceau-S angefärbt, die dadurch deutlich sichtbare Proteinbande exakt ausgeschnitten und in kleinere Stücke zerteilt. Die Membranstücke wurden ÜN bei 4 °C mit 2 ml des polyklonalen Rohserums inkubiert und anschließend zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Antikörpern in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit je 10 ml Waschlösung nach folgendem Schema gewaschen:

3x 5 min 1x PBS/0, 1% BSA

2x 5 min 1x PBS/0,1% BSA + 0,1% NP-40

3x 5 min 1x PBS/0,1% BSA

Schließlich erfolgte die Ablösung der spezifischen Antikörper durch kurze und schnelle Absenkung des pH-Wertes. Dazu wurde zu den gewaschenen Membranstücken 750 µl einer 0,2M Glycin/HCL-Lösung (pH 2,7) gegeben, die Lösung genau eine Minute per Hand vorsichtig geschüttelt und zur Neutralisation der Antikörperlösung diese in 375 µl einer eiskalten 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung pipettiert. Dabei wurde ein pH-Wert von etwa 7,5 erhalten. Dieser Schritt wurde wiederholt und die beiden neutralisierten Eluate vereinigt. Für die Stabilisierung der Antikörper wurde der Lösung BSA zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -21 °C, wobei einmal aufgetaute Lösungen nicht wieder eingefroren, sondern bei 4 – 6 °C gelagert wurden.

### 5.6.3 Westernblot-Analysen

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen mittels Westernblot-Analysen wurden Proteinlösungen und Zellextrakte aus *C. reinhardtii* verwendet. Proteinlösungen wurden mit der entsprechenden Menge an 3-fach Probenpuffer nach Lämmli (Lämmli, 1970) versetzt und für 3 min auf 95 °C erhitzt. Zur Herstellung von Zellextrakten aus *C. reinhardtii*-Zellen wurden die durch Zentrifugation geernteten Algenzellen in 1-fach Probenpuffer nach Lämmli (Lämmli, 1970) resuspendiert und für 3 min auf 95 °C erhitzt. Die Proteingemische wurden

anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und das erhaltene Proteinmuster mittels der "semidry"-Methode (Trans-Blot SD Semi-Dry-Apparatur, Fa. Biorad, Hercules, CA, USA) auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond™-C Extra, Fa. Amersham, Piscataway, NJ, USA) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte in einem kontinuierlichen Puffersystem (Transferpuffer: 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % v/v Methanol, pH ~ 9,2) bei 2 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche für 45 min. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Membranen mit einer Ponceau-S-Lösung (0,2 % Ponceau-S, 3% Trichloressigsäure, 3 % Sulfosalicylsäure) angefärbt und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O solange entfärbt, bis das Proteinmuster sichtbar wurde. Die Membranen wurden in PBS-T (PBS-Puffer + 0,1 % Tween 20) vollständig entfärbt und mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (Merck) in PBS-T für mindestens eine Stunde bei RT blockiert. Für die Immunodetektion wurde das ECL-Detektionssystem der Fa. Amersham verwendet. Als Primärantikörper dienten die gereinigten anti-ChR1/ChR2-Antikörper (siehe Kapitel 3.1.2), und als Sekundärantikörper wurde ein an Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-rabbit-IgG-Antikörper (NA934, Amersham, Piscataway, NJ, USA) verwendet. Die Inkubation mit den in PBS-T verdünnten primären Antikörpern erfolgte ÜN bei RT. Anschließend wurden die Membranen mit PBS-T gewaschen (1 x 15 min, 2 x 5 min) und mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in PBS-T, für eine Stunde inkubiert. Nach einem zweiten Waschschriff mit PBS-T (1 x 15 min, 5 x 5 min) erfolgte die Detektion der spezifischen Proteinbanden über Chemolumineszenz unter Verwendung des Amersham *ECL™ Westernblotting Detection Reagents* durch Exposition der Membranen auf einen Röntgenfilm (HyperFilm ECL, Fa. Amersham, Piscataway, NJ, USA).

### 5.6.4 Wiederablösen (*Strippen*) der Antikörper von Nitrocellulosemembranen

Die Wiederablösung der Komplexe aus primären und sekundären Antikörpern von den Nitrocellulose-Membranen nach erfolgter Detektion erfolgte durch Inkubation der Membran in einem so genannten „*stripping*“-Puffer (100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) für 30 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln. Hierauf folgten zwei Waschschriffe in PBS-T-Puffer für je 15 min bei RT unter sanftem Schütteln (50 - 100 UpM). Nach erneutem blockieren mit 5 % Magermilchpulver in PBS-T (1 h, RT, 50 UpM) wurden Antikörperhybridisierung und Detektion wiederholt.

### 5.6.5 Quantifizierung der Westernblot-Signale

Die Bestimmung des ChR1- bzw. ChR2-Gehalts der untersuchten Zellextrakte wurde mit dem Programm Optiquant Version 2.5 (Fa. Packard Instruments Co.) durchgeführt. Dazu wurden die entwickelten Filme mit einer Auflösung von 150 dpi und einer Farbtiefe von 24 Millionen Farben eingescannt, anschließend in ein Graustufenbild mit 16-Bit Farbtiefe umgewandelt und nach Invertierung der Farben im *Tagged Image File Format* (TIF) abgespeichert. Hierauf erfolgte die densitometrische Quantifizierung der Westernblot-Signale mit dem Programm *Optiquant*, wobei die Signalstärke als Maß des Proteingehalts immer relativ zur Kontrolle oder zu den Vergleichsproben in Prozent angegeben wurde.

### 5.6.6 Immunofluoreszenz-Analysen

#### 5.6.6.1 Präparation der Zellen

Für die Immunofluoreszenz-Analyse wurden vegetative Zellen und Gameten des Wildtypstammes *CC124mt* verwendet. Hierzu wurden 15 ml einer gut gewachsenen Algenkultur geerntet (800 g, 5 min, RT) und zur enzymatischen Entfernung der Zellwand in 5 ml Gameten-Autolysin in einem 10 ml Becherglas resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen unter vorsichtigem Rühren auf einem Magnetrührer unter Beleuchtung mit einer Schreibtischlampe (60 W) für eine Stunde inkubiert. Zur Stabilisierung der Mikrotubuli des Zytoskeletts wurden 5 ml eines Mikrotubuli-stabilisierenden Puffers mit 10% Hexylenglykol (MTSB/HG) innerhalb von 10 min langsam zugegeben.

MTSB/HG-Puffer: 30 mM Pipes pH 6.8  
25 mM KCl  
5 mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O  
5 mM EGTA  
10% Hexylenglykol

Hierauf wurde ein großer Tropfen der Zellsuspension für 15 min auf ein mit poly-L-Lysin (Sigma P8920) beschichtetes Deckglas (22 x 22 mm) aufgebracht, wodurch die Zellen an die beschichtete Oberfläche angeheftet werden konnten. Der Puffer wurde vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, durch reinen MTSB/HG-Puffer ersetzt, und nach erneutem Absaugen des Puffers die Zellen mit Fixierlösung (MTSB-HG-Puffer, 4 % v/v para-Formaldehyd, 0,3 % v/v NP-40) für 45 min fixiert. Dabei wurden die Zellmembranen durch das Detergens NP-40 aufgelöst und die Proteine durch die quervernetzende Wirkung des para-Formaldehyds fixiert. Hierauf erfolgten vier aufeinander folgende Waschschrte in 500 ml PBS-T Waschpuffer (1 x PBS + 0,05 % v/v Tween 20), wobei das Deckglas mit einer Pinzette vorsichtig in der Waschlösung hin und her bewegt wurde. Die Waschlösung wurde so weit wie möglich entfernt und die fixierten Zellen mit einem Tropfen Blockierpuffer (1 x PBS, 0,05 % Tween 20, 1 % BSA, 0,02 % Na-Azid) für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für zwei Stunden bei RT mit einem Tropfen von den in Blockierpuffer verdünnten primären Antikörpern. Nicht gebundene primäre Antikörper wurden in vier aufeinander folgenden Waschschrten in PBS-T entfernt, bevor die Zellen mit den sekundären Antikörpern inkubiert wurden. Hierbei wurden mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierte sekundäre Antikörper, verdünnt in Blockierpuffer (1:200), verwendet. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei RT in Dunkelheit. Von nun an wurden alle Arbeitsschritte bei gedämpftem Raumlicht durchgeführt und die Deckgläser unter Ausschluss von Licht aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Die verwendeten Antikörper und ihre Verdünnung ist der nachstehenden Tabelle zu entnehmen:

<b>primärer Antikörper</b>	<b>sekundärer Antikörper</b>
anti-ChR1-Antikörper (1:100) anti-ChR2-Antikörper (1:100)	Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG (1:200; Invitrogen A11010)
anti- $\alpha$ -Tubulinantikörper (1:400; Sigma B5-1-2)	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (1:200; Invitrogen A11001)

Die Analyse der Präparate wurde mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 (Fa. Zeiss, Göttingen, BRD) durchgeführt.



## **5.7 Elektrophysiologische Messungen**

### **5.7.1 Das Messprinzip**

Für die Messung der lichtinduzierten Photoströme in *C. reinhardtii* wurde die so genannte Saugelektrodenmessung (Litvin et al., 1978; Harz & Hegemann, 1991) verwendet. Bei dieser extrazellulären Methode wird die zu untersuchende Zelle mit Hilfe von Unterdruck in eine spezielle ausgezogene Glaspipette (Messpipette) teilweise eingesaugt, wobei zwischen dem Innern der Pipette und der Badlösung ein hoher Abdichtwiderstand ( $120 - 150 \Omega$ ) erreicht wird. Auf diese Weise können die durch die Zelle fließenden lichtinduzierten Ströme abgeleitet werden.

Eine detaillierter Beschreibung des Messprinzips findet sich in Harz et al. (1992).

### **5.7.2 Der Messaufbau**

Ein inverses Mikroskop (Axiovert 100, Fa. Zeiss, Göttingen, BRD) kombiniert mit einer infrarot-empfindlichen Videokamera bildete den zentralen Bestandteil des Messstandes. Als Beobachtungslicht diente infrarotes Licht  $> 700 \text{ nm}$ , das mit einem RG9-Glasfilter (Fa. Schott, Mainz, BRD) erzeugt wurde. Der Fluoreszenzstrahleneingang des Mikroskops diente als Reizlichtstrahlengang zur Stimulierung der Algen durch Licht. Die Messpipetten waren an einem Vorverstärker (siehe Kapitel 5.7.3) angebracht, der seitlich am Mikroskoptisch auf einem manuell verstellbaren Mikromanipulator befestigt war und mit dessen Hilfe die Messpipetten genau positioniert werden konnten. Zur Abschirmung von elektrischen Störsignalen befand sich der gesamte Messaufbau innerhalb eines faradayschen Käfigs auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Detaillierte Ausführungen über den Messaufbau sind der Arbeit von Holland (1997) zu entnehmen.

### **5.7.3 Datenaufnahme und Auswertung**

Die elektrischen Signale wurden mit Hilfe eines „Patch-Clamp“ Verstärkers (EPC-7, List Elektronik, Darmstadt, BRD) und dem dazugehörigen Vorverstärker, an dem die Messpipette befestigt war, aufgezeichnet. Das analoge Signal wurde über ein

*Digidata 1322A* Messinterface (Axon Instruments, Union City, CA, USA) digitalisiert und mittels der Software *pClamp* (V Piscataway, NJ, USA ersion 9.2; Axon Instruments, Union City, CA, USA) aufgezeichnet. Die zeitliche Auflösung der Datenaufnahme lag bei 20  $\mu$ s. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *ClampFit* ((Axon Instruments, Union City, CA, USA), wobei die Rohdaten vor der Auswertung durch Anwendung einer Gauss-Tiefenpassfilterung (Frequenz 1000 Hz) geglättet wurden.

### 5.7.4 Die Messpipetten

Als Messpipette wurden der von Braun (1997) beschriebene Pipettentyp für die Messung in der Konfiguration mit eingesaugtem Augenfleck verwendet. Dazu wurden Glaskapillaren aus Borosilikatglas ( $\varnothing$ : 1,8 mm; Wandstärke: 0,15 mm, Kimax-51; Kimble Glass Inc., USA) auf 8 mm Länge gekürzt und anschließend in zwei Zügen gezogen (L/M-3P-A Puller, List, Darmstadt, BRD).

Zugbedingungen: 1. Zug: > 20 A Heizstrom, 7mm Abstandshalter  
Rezentrierung mit einem 12,5 mm Abstandshalter  
2. Zug: 12,6 A Heizstrom

Die Öffnung der Pipette wurde anschließend unter mikroskopischer Kontrolle poliert, so dass ihr Durchmesser ca. 1,5  $\mu$ m betrug. Da dies unter dem Mikroskop nicht genau kontrolliert werden konnte, wurde zur Bestimmung der Öffnungsweite die „*bubble number*“ (Lew et al., 1990) der polierten Pipetten bestimmt. Die Pipetten wurden dazu mit dem unbehandelten Ende über einen Kurzen Gummischlauch mit einer 10 ml-Kunststoffspritze (Omnifix, Braun) verbunden, deren Stempel genau auf die 10 ml-Markierung eingestellt war. Die Pipettenspitze wurde in Ethanol (p. a.) getaucht und durch Drücken des Stempels ein Überdruck erzeugt. Dieser wurde solange erhöht, bis aus der Pipettenspitze Bläschen austraten und dann der Wert der Stempelstellung an der Kalibrierung der Spritze abgelesen („*bubble number*“). Eine Öffnungsweite von 1,5  $\mu$ m entsprach dabei einer „*bubble number*“ von 6,7. Der Öffnungswinkel dieser Pipetten betrug 30°, der Widerstand 15 bis 20 M $\Omega$ , nach Einsaugen des Augenflecks 120 bis 150 M $\Omega$ .

### 5.7.5 Der Messpuffer

Für die elektrophysiologischen Messungen wurde folgender Messpuffer verwendet:

**Messpuffer:**        5 mM HEPES  
                          9 mM HCl  
                          0,1 mM KCl  
                          10  $\mu$ M BAPTA

Der pH-Wert wurde mit N-Methyl-D-glucamin (NMG) auf 6,8 eingestellt. Die relativ hohe Chlorid-Konzentration ist notwendig, um ein stabiles Potential der Silberchloridelektroden zu gewährleisten. Die Zugabe des Kalzium-Chelators BAPTA (Bis(o-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure) diente dazu, die Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  konstant zu halten und eventuell noch vorhandene Schwermetall-Ionen zu komplexieren, welche die Ionenkanäle inhibieren könnten. Die absolute  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge, die dem Puffer zugesetzt werden musste, um eine freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 200  $\mu$ M zu erhalten, wurde nach Holland et al. (1996) berechnet.

### 5.7.6 Chlorieren der Silberelektroden

Als Messelektroden wurde ein chlorierter Silberdraht verwendet. Nach mechanischer Reinigung mittels eines scharfen Skalpells wurde der blanke Silberdraht zusammen mit einer Platinelektrode in eine 0,5 M KCl-Lösung getaucht. Zur vollständigen Entfernung der Silberoxidschicht wurde der Silberdraht an den Minuspol und die Platinelektrode an den Pluspol einer 1,5 V Batterie angeschlossen. Nach ca. 5 min wurden die beiden Elektroden umgepolt und ein Widerstand von 1  $\Omega$  zwischengeschaltet. Anschließend erfolgte die Chlorierung der Silberelektrode für 5 – 10 Minuten.

### 5.7.7 Unterdruckapplikation

Um lokalisierte Ionenströme mit der Saugelektrodenteknik messen zu können, war es notwendig einen Teil der Zelle in die Messpipette einzusaugen. Zu diesem Zweck wurde eine Unterdruckapplikation aufgebaut. Ein nach dem Prinzip kommunizierender Röhren gestaltetes, mit destilliertem Wasser gefülltes System, war über einen Schlauch und ein T-Stück mit 3-Wege-Hahn an den Saugstutzen des Elektrodenhalters des EPC-7-Vorverstärkers (List, Darmstadt, BRD) angekoppelt. Der Elektrodenhalter war so konstruiert, dass die Druckverhältnisse im Halter denen in der Messpipette entsprachen. An den dritten Ausgang des T-Stückes war über einen Schlauch ein Mundstück (Pipettenspitze 1000 µl) angebracht, mit dessen Hilfe man die Höhe der Flüssigkeitssäulen im kommunizierendem System variieren kann. Auf diese Weise war es möglich, sowohl Über- als auch Unterdruck in der Messpipette zu erzeugen.

### 5.7.8 Applikation und Variation des Reizlichtes

Die Zellen wurden mit Lichtpulsen von 300 µs Dauer stimuliert. Als Reizlichtquelle diente eine Xenon-Kurzbogenlampe (XBO 75 Watt; Osram, BRD) welche in einem Lampengehäuse (Leistungselektronik JENA GmbH, Jena, BRD) eingebaut war und über das Vorschaltgerät *ebx 75* (Leistungselektronik JENA GmbH, Jena, BRD) betrieben wurde. Als Reizlicht wurde monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von  $500 \pm 40$  nm durch einen Interferenzfilter (Fa. Balzers, Liechtenstein) verwendet. Die Steuerung der Reizlichtapplikation erfolgte über das Digidata 1322A Messinterface durch Ansteuerung eines Shutters (Typ LS-6, Vincent Associates, Rochester, NY, USA) über die Steuereinheit VMM-T1 (Vincent Associates, Rochester, NY, USA). Das Reizlicht wurde über Quarz-Lichtwellenleiter () in den Auflichtfluoreszenzstrahlengang des Mikroskops eingestrahlt. Die Lichtintensität in der Objektebene wurde mittels eines Leistungsmessgerätes bei Verwendung des Trockenobjektives mit 40facher Vergrößerung (numerischer Apertur = 0,75) ermittelt und betrug  $3 \cdot 10^{22}$  Photonen/m<sup>2</sup>s.

### **5.7.9 Vorbereitung der Zellen für die Saugelektrodenmessung**

Für die Messungen wurden Gameten und im Falle der RNAi-Transformante H-17 auch vegetative Zellen verwendet. Gameten wurden in stickstofffreiem NMM-Medium wie unter 5.2.3 beschrieben hergestellt. Vegetative Zellen wurden in HSA-Puffer kultiviert. Da mit den RNAi-Mutanten keine Photo Selektion zur Konzentrierung phototaktisch aktiver Zellen möglich war, wurde darauf generell verzichtet. Für die Messung wurden 10 - 20 ml Zellen geerntet (800 g, 5min, RT), einmal mit 10 ml Messpuffer gewaschen und schließlich in 1 ml Messpuffer zu einer OD<sub>800</sub> von etwa 0,5 resuspendiert. Die Messungen fanden bei angeschaltetem Raumlicht statt.

### **5.7.10 Durchführung der Messungen**

Für die Messung wurde eine mit Messpuffer gefüllte Messpipette über die Silberchloridelektrode des Vorverstärkers geschoben und dort befestigt. Anschließend wurde ein Deckglas (24 x 32 mm, Fa. Roth, Karlsruhe, BRD) auf dem Gleittisch des Mikroskops befestigt und 200 µl Messpuffer darauf gegeben. Anschließend wurde die Messpipette mit Hilfe der Mikromanipulatoren unter seitlicher und mikroskopischer Sichtkontrolle in den Messpuffer gefahren und in die Messposition nahe an der Objektebene gebracht. Um die Zellen nicht der hohen Lichtintensität des weißen Mikroskoplichts auszusetzen, wurde vor Zugabe von 50 µl der Zellsuspension das Weißlicht durch Einschwenken des Infrarotfilters RG9 (Fa. Schott, Mainz, BRD) gefiltert. Die Verstärkung des EPC-7 Hauptverstärkers wurde auf 100 mV/pA eingestellt und anschließend die ausgewählte Zelle durch Anlegen eines Unterdrucks mit dem Augenfleck voran in die Messpipette eingesaugt, bis ein Abdichtwiderstand von 120 – 170 MΩ erreicht war. Anschließend wurde die Potentialdifferenz über den V<sub>P</sub>-Offset des Hauptverstärker auf 0 mV abgeglichen und die Messung gestartet, während dieser die Zelle mit einem Lichtpuls von 300 µs Dauer stimuliert wurde. Während der Messung wurde darauf geachtet, dass sich die Position der Zelle in der Messpipette unverändert blieb, da sich Änderungen des Abdichtwiderstandes und des Anteils an eingesaugter Membranfläche zwangsläufig auf die Größe der Stromamplitude auswirkten (Harz & Hegemann, 1991).

## 5.8 Bewegungsanalysen

### 5.8.1 Phototaxis-Assay bei Tageslicht

Zur Untersuchung der Phototaxis von *C. reinhardtii* bei Tageslicht wurden die Zellen in einer Petrischale in Messpuffer zu einer OD<sub>800</sub> von 0,4 resuspendiert und vor einem Fenster aufgestellt. Anschließend wurde die phototaktische Bewegung der Zellen zur lichtabgewandten Seite (negative Phototaxis) der Petrischale verfolgt und mit einer Digitalkamera dokumentiert. Die Lichtintensität betrug etwa 5 W / m<sup>2</sup> (United Detector Technology, Model 40x). Hierzu wurde folgender Messpuffer verwendet:

**Meßpuffer:**            5 mM HEPES  
                             9 mM HCl  
                             0,1 mM KCl  
                             0,3 mM CaCl<sub>2</sub>

Der pH-Wert wurde mit N-Methyl-D-glucamin (NMG) auf 6,8 eingestellt.

### 5.8.2 Analyse der photophobischen Reaktion mittels Bildverarbeitung

#### 5.8.2.1 Messaufbau

Die photophobische Reaktion von *C. reinhardtii* wurde mit dem Echtzeit-Bildverarbeitungssystem *WinTrack 2000 XP* (Fa. Real Time Computers, Erlangen) durchgeführt. Hierzu wurde das inverse Mikroskop Axiovert 100 (Fa. Zeiss, Göttingen, BRD) zusammen mit einem Dunkelfeldkondensor und einem 5fach Objektiv verwendet. Als Beobachtungslicht wurde infrarotes Licht > 700 nm verwendet, dass mittels eines RG9-Glasfilters (Fa. Schott, Bonn, BRD) erzeugt wurde. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit Lichtblitzen (Blitzlampe: FXQG-949-1, T.I.L.L. Photonics, München, BRD), die über einen Quarz-Lichtwellenleiter (Optran UV, 1250/1325 BLN, n. A. 0,22, CeramOptec GmbH, Bonn, BRD) in den Fluoreszenzstrahlengang des Mikroskops eingestrahlt wurden. Das Licht wurde nach Austritt aus dem Lichtwellenleiter mit einem K50-Interferenzfilter (500 ± 40nm, Fa. Balzers, Liechtenstein) gefiltert. Die Lichtintensität betrug  $4 \cdot 10^{22}$  Photonen/m<sup>2</sup>s. Die

Bewegung der Zellen wurde mit Hilfe einer Infrarot-Kamera, die an einen sw-Kontrollmonitor angeschlossen war, über einen DVD-Rekorder zur späteren Auswertung auf DVD-Rohlinge aufgezeichnet.

### 5.8.2.2 Der Messpuffer

Die Analyse der photophobischen Reaktion wurde in folgendem Messpuffer durchgeführt:

**Meßpuffer:**            5 mM HEPES  
                             9 mM HCl  
                             0,1 mM KCl  
                             0,3 mM CaCl<sub>2</sub>

Der pH-Wert wurde mit N-Methyl-D-glucamin (NMG) auf 6,8 eingestellt.

### 5.8.2.3 Vorbereitung der Zellen

Die Analyse der photophobischen Reaktion wurde an Gameten und vegetativen Zellen der Zellwandmutante *cw2* durchgeführt. Gameten wurden in stickstofffreiem NMM-Medium hergestellt (siehe Kapitel 5.2.3) und vegetative Zellen in HSA-Medium ohne Sorbitol kultiviert, da diese die Phototaxis aus bislang unbekannten Gründen negativ beeinflusst (P. Hegemann, persönliche Mitteilung). Vor der Messung wurden die Zellen geerntet (800 g, 5 min, RT), einmal mit Messpuffer gewaschen und schließlich mit Messpuffer so stark verdünnt, dass im Dunkelfeld unter dem Mikroskop die Einzelzellen deutlich unterschieden werden konnten. Die Zellsuspension wurde in eine Fluoreszenzküvette (29-F SOG, Fa. Starna, England) gefüllt und diese auf dem Objektisch des Mikroskops befestigt.

### 5.8.2.4 Auswertung

Die Auswertung der Schwimmgeschwindigkeiten erfolgte mit dem *LongTrackModule* des Programms *WinTrack XP 2000*. Hiermit konnte die Schwimmgeschwindigkeit

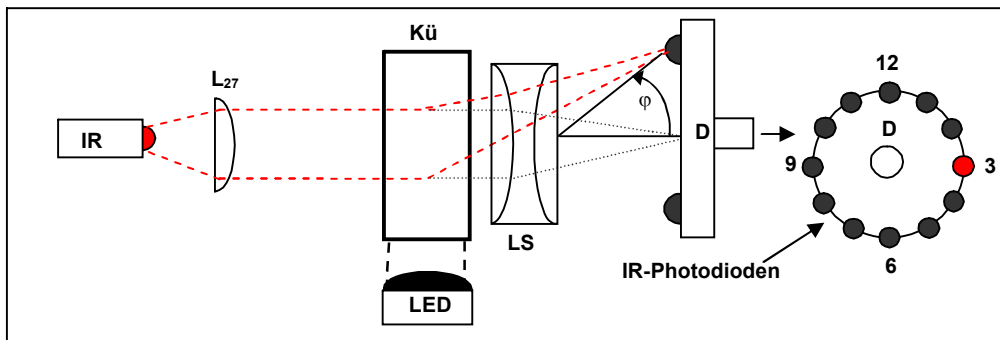
mehreren Zellen gleichzeitig über einen längeren Zeitraum aufgezeichnet werden. Die Programmeinstellungen wurden dabei so vorgenommen, dass mindesten 150 Zellen gleichzeitig erkannt und verfolgt wurden. Neben der Schwimmgeschwindigkeit konnte auch die Stopp-Reaktion als phobisches Ereignis (*phobic event*) ermittelt werden, wobei als Kriterium für ein phobisches Ereignis ein Abfall der Schwimmgeschwindigkeit um mindestens 60 Prozent galt. Die Anzahl der Zellen, die zu einem beliebigen Zeitpunkt dieses Kriterium erfüllten wurde von dem Programm automatisch ermittelt und konnte zusammen mit dem Geschwindigkeitsdiagramm in Form von Balkendiagrammen dargestellt werden.

### 5.8.3 Lichtstreuanalysen

#### 5.8.3.1 Aufbau und Funktion der Lichtstreu-Apparatur

Für die Lichtstreuumessung an *Chlamydomonas* wurde eine Apparatur nach Uhl & Hegemann (1990) und Schaller et al. (1997) verwendet (Abbildung 5.1). Ein IR-Emitter (Hitachi, Typ HE8812SG) sendet infrarotes Licht ( $\lambda = 850\text{nm}$ ) aus, das nach Parallelisierung durch eine Sammellinse ( $f = 27\text{ mm}$ ) und Durchtritt durch die Küvette mittels eines Zwei-Linsensystems, mit einer Gesamt-Brennweite von 35 mm bestehend aus zwei Sammellinsen mit einer Brennweite von je 80 mm, auf die Mitte des Detektorringes fokussiert wird. Der Detektorring enthält 12 im Uhrzeigersinn angeordnete IR-Dioden (Typ SFH2030-F; Fa. Siemens, BRD), die in einem festen Winkel  $\varphi = 16^\circ$  in Bezug auf die Mittelachse montiert sind. Der Winkel  $\varphi = 16^\circ$  wurde gewählt, da hier die Streuung des Lichts an den Algenzellen am stärksten ist (Schaller et al., 1997). Als Reizlichtquelle dienten Hochleistungs-LEDs der Wellenlängen  $455 (\pm 20)$ ,  $505 (\pm 30)$  und  $530 (\pm 35)\text{ nm}$  (Typ LUXEON Star, Lumileds Lighting, San Jose, CA, USA), die auf einem Filterrad befestigt waren und so durch Drehen seitlich vor der Messküvette platziert werden konnten. Die von den IR-Dioden erzeugten Photoströme wurden über einem Strom-Spannungswandler mit  $10^6\text{ V/A}$  in eine Gleichspannung konvertiert und nach einer 10 Hz-Tiefenpassfilterung durch den Verstärker Cyber Amp 320 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) über das Digidata 1322A-Interface (Axon Instruments, Union City, CA, USA) mit dem Programm pClamp für Microsoft Windows (Version 9.2; Axon Instruments, Union City, CA, USA) aufgezeichnet.





**Abbildung 5.1. Schematischer Aufbau des Lichtstreu-Apparates.** IR: Infrarot-Emitter  $\lambda = 850\text{nm}$ ,  $L_{27}$ : Sammellinse mit  $f = 27\text{ mm}$ , Kü: Küvette, LS: Linsensystem aus zwei Sammellinsen mit je  $80\text{ mm}$  Brennweite im Abstand von  $2,5\text{ cm}$  ( $f_{\text{gesamt}} = 35\text{ mm}$ ), D: Detektorring mit 12 IR-Photodioden, LED: Reizlichtquelle (*light emitting diode*).

### 5.8.3.2 Prinzip der Lichtstreuungsmessung

Befindet sich in der Küvette eine Algensuspension, so wird das IR-Licht auf die einzelnen Dioden gestreut. Da die Algenzellen ohne Reizlicht statistisch orientiert sind, kann keine Änderung des Lichtstreusignals bzw. der Spannung detektiert werden. Sobald das Reizlicht eingeschaltet wird, richten sich die Zellen in diesem Licht aus. Durch diese Orientierungsänderung und die damit verbundene Änderung der Lichtstreuung fällt nun entweder mehr (Spannungsanstieg) oder weniger (Spannungsabfall) IR-Licht auf die einzelnen IR-Dioden. Sobald sich alle Zellen ausgerichtet haben geht die Spannungsänderung wieder gegen Null.

### 5.8.3.3 Der Messpuffer

Für die Lichtstreuungsmessungen wurde folgender Messpuffer verwendet:

**Meßpuffer:**

- 5 mM HEPES
- 9 mM HCl
- 0,1 mM KCl
- 0,3 mM  $\text{CaCl}_2$

Der pH-Wert wurde mit N-Methyl-D-glucamin (NMG) auf 6,8 eingestellt.

#### **5.8.3.4 Vorbereitung der Zellen für die Lichtstreuemessungen**

Für die Lichtstreuemessungen wurden Gameten oder vegetative Zellen der Zellwandmutante *cw2* verwendet. Gameten wurden in stickstofffreiem NMM-Medium hergestellt und vegetative Zellen in HSA-Medium ohne Sorbitol, da diese die Phototaxis aus bislang unbekannten Gründen negativ beeinflusst (P. Hegemann, persönliche Mitteilung), kultiviert. Vor der Messung wurden 50 ml der Zellkultur geerntet (800 g, 5 min, RT), einmal mit 50 ml Messpuffer gewaschen und davon, unter Verwendung eines 250 ml-Erlenmeyerkolbens, so viele Zellen in 150 ml Messpuffer vorsichtig resuspendiert, bis die Algensuspension eine  $OD_{800}$  von 0,1 aufwies. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf einem Rundschüttler (120 UpM) bei Raumlicht und Raumtemperatur geschüttelt, um die Zellen an den Messpuffer zu adaptieren.

#### **5.8.3.5 Durchführung der Lichtstreuemessungen**

Für die Messung wurde die Messküvette mit der Zellsuspension befüllt (ca. 5 ml), in die Messapparatur eingesetzt und der Deckel der Apparatur geschlossen. Nach einer Wartezeit von 10 s wurde die Messung gestartet. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Zellsuspension jeweils wieder zurück in das Ausgangsgefäß gegeben.

## 6 Literaturverzeichnis

**Baulcombe, D. (2004).** "RNA silencing in plants." *Nature* 431(7006): 356-63.

**Beckmann, M. and P. Hegemann (1991).** "In vitro identification of rhodopsin in the green alga *Chlamydomonas*." *Biochemistry* 30(15): 3692-7.

**Berthold, P., R. Schmitt and W. Mages (2002).** "An engineered *Streptomyces hygroscopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Protist* 153(4): 401-12.

**Braun, F. J. (1997).** „Untersuchung von Photorezeptorströmen und intrazellulären Ionenkonzentrationen in *Chlamydomonas reinhardtii* und *Volvox carteri*. Dissertation. Universität Regensburg.

**Bruce, V. G. (1970).** "The biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*." *J. Protozool.* 17: 328-334.

**Deininger, W., P. Kroger, U. Hegemann, F. Lottspeich and P. Hegemann (1995).** "Chlamyrodopsin represents a new type of sensory photoreceptor." *Embo J* 14(23): 5849-58.

**Derguini, F., P. Mazur, K. Nakanishi, D. M. Starace, J. Saranak and K. W. Foster (1991).** "All-trans-retinal is the chromophore bound to the photoreceptor of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Photochem Photobiol* 54(6): 1017-21.

**Dutcher, S. K. (1995).** "Flagellar assembly in two hundred and fifty easy-to-follow steps." *Trends Genet* 11(10): 398-404.

**Ehlenbeck, S., D. Gradmann, F. J. Braun and P. Hegemann (2002).** "Evidence for a light-induced H(+) conductance in the eye of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biophys J* 82(2): 740-51.

**Ehrenberg, GS. (1883).** "Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen." (Ed Engelmann TW), p 15. Leipzig

**Famintzin, A (1878).** "Die Wirkung des Lichtes auf Algen und einige andere ihnen verwandte Organismen. Jahrb wiss Bot

**Foster, K. W., J. Saranak, N. Patel, G. Zarilli, M. Okabe, T. Kline and K. Nakanishi (1984).** "A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*." Nature 311(5988): 756-9.

**Foster, K. W. and R. D. Smyth (1980).** "Light Antennas in phototactic algae." Microbiol Rev 44(4): 572-630.

**Fuhrmann, M., A. Hausherr, L. Ferbitz, T. Schodl, M. Heitzer and P. Hegemann (2004).** "Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene." Plant Mol Biol 55(6): 869-81.

**Fuhrmann, M., A. Stahlberg, E. Govorunova, S. Rank and P. Hegemann (2001).** "The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses." J Cell Sci 114(Pt 21): 3857-63.

**Goodenough, U. W. (1992).** "Green yeast." Cell 70(4): 533-8.

**Govorunova, E. G., K. H. Jung, O. A. Sineshchekov and J. L. Spudich (2004).** "*Chlamydomonas* sensory rhodopsins A and B: cellular content and role in photophobic responses." Biophys J 86(4): 2342-9.

**Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom and D. Hanahan (1990).** "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants." Proc Natl Acad Sci U S A 87(12): 4645-9.

**Grossman, A. R., M. Lohr and C. S. Im (2004).** "*Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments." Annu Rev Genet 38: 119-73.

**Gruber, H. E. and B. Rosario (1974).** "Variation in eyespot ultrastructure in *Chlamydomonas reinhardtii* (ac-31)." J Cell Sci 15(3): 481-94.

**Gumpel, N. J., J. D. Rochaix and S. Purton (1994).** "Studies on homologous recombination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Curr Genet 26(5-6): 438-42.

**Häder, D.-P., Colombetti, G., Lenci, F. and Quaglia, M (1981).** "Phototaxis in the flagellates, *Euglena gracilis* and *Ochromonas danica*". Arch Microbiol 130: 78 – 82.

**Haldall, P. (1957).** "Importance of calcium and magnesium ions in phototaxis of motile green algae." Nature 26: 215-216.

**Hanahan, D. (1983).** "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol 166(4): 557-80.

**Harris, E. H. (1989).** The *Chlamydomonas* sourcebook. San Diego, Academic.

**Harris, E. H. (2001).** "*Chlamydomonas* As A Model Organism." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52: 363-406.

**Harz, H., C. Nonnengasser and P. Hegemann (1992).** "The photoreceptor current of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*." Phil Trans R Soc Lond B 338: 39-52.

**Harz, H. and P. Hegemann (1991).** "Rhodopsin regulated calcium currents in *Chlamydomonas*." Nature 351: 489-491.

**Hegemann, P. and H. Harz (1998).** "How microalgae see the light." In: Microbial responses to light and time, Cambridge University Press

**Hegemann, P. (1997).** "Vision in microalgae." Planta 203(3): 265-74.

**Hegemann, P. and B. Bruck (1989).** "The light induced stop-response in *Chlamydomonas*. Occurrence and adaptation phenomena." *Cell Motil Cytoskeleton* 14: 501-515.

**Holland, E. M., F. J. Braun, C. Nonnengasser, H. Harz and P. Hegemann (1996).** "The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. I. Kinetics and influence of divalent ions." *Biophys J* 70(2): 294-931.

**Holland, E. M., H. Harz, R. Uhl and P. Hegemann (1997).** "Control of phobic behavioral responses by rhodopsin-induced photocurrents in *Chlamydomonas*." *Biophys J* 73(3): 1395-401.

**Hutner, S. H., L. Provasoli, A. Schatz and C. P. Haskins (1950).** "Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms." *Proc Americ Phil Soc*.

**Kateriya, S., G. Nagel, E. Bamberg and P. Hegemann (2004).** ""Vision" in single-celled algae." *News Physiol Sci* 19: 133-7.

**Kindle, K. L. (1990).** "High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(3): 1228-32.

**Kreimer, G. and M. Melkonian (1990).** "Reflection confocal laser scanning microscopy of eyespots in flagellated green algae." *Eur J Cell Biol* 53(1): 101-11.

**Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.

**Lew, R., B. Serlin, C. Schauf and M. Stockton (1990).** "Red light regulates calcium-activated potassium channels in *Mougeotia* plasma membrane." *Plant Physiol* 92: 822-830.

**Litvin, F. F., O. A. Sineshchekov and V. A. Sineshchekov (1978).** "Photoreceptor electric potential in the phototaxis of the alga *Haematococcus pluvialis*." *Nature* 271(5644): 476-8.

**Mayer, A. M. (1968).** "*Chlamydomonas*: Adaption phenomena in phototaxis." 217: 875-876.

**Melkonian, M. and H. Robenek (1980).** "Eyespot membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a freeze-fracture study." *J Ultrastruct Res* 72(1): 90-102.

**Melkonian, M. and H. Robenek (1984).** "The eyespot apparatus of flagellated green algae: a critical review." *Prog Phycol Res* 3: 193-286.

**Minke, B. (1977).** "*Drosophila* mutant with a transducer defect." *Biophys Struct Mech* 3(1): 59-64.

**Mittag, M., S. Kiaulehn and C. H. Johnson (2005).** "The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to?" *Plant Physiol* 137(2): 399-409.

**Moran, M. M., H. Xu and D. E. Clapham (2004).** "TRP ion channels in the nervous system." *Curr Opin Neurobiol* 14(3): 362-9.

**Nagel, G., D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg and P. Hegemann (2002).** "Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae." *Science* 296(5577): 2395-8.

**Nagel, G., T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann and E. Bamberg (2003).** "Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 13940-5.

**Nagel, G., T. Szellas, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Hegemann and E. Bamberg (2005).** "Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 4): 863-6.

**Nonnengässer, C., E. M. Holland, H. Harz and P. Hegemann (1996).** "The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. II. Influence of monovalent ions." *Biophys J* 70(2): 932-8.

**Nultsch, W., G. Throm and von Rimscha I (1971).** "Phototaktische Untersuchungen an *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in homokontinuierlicher Kultur." *Arch Mikrobiol* 80: 351-361.

**Piperno, G., B. Huang, Z. Ramanis and D. J. Luck (1981).** "Radial spokes of *Chlamydomonas* flagella: polypeptide composition and phosphorylation of stalk components." *J Cell Biol* 88(1): 73-9.

**Quail, P. H. (1984).** "Phytochrome: a regulatory photoreceptor that controls the expression of its own gene." *Trends in Biochem Sciences* 9: 450-453.

**Rohr, J., N. Sarkar, S. Balenger, B. R. Jeong and H. Cerutti (2004).** "Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas*." *Plant J* 40(4): 611-21.

**Sambrook, J. and D. W. Russel (2001).** *Molecular Cloning. A laboratory manual.* New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Schaller, K., R. David and R. Uhl (1997).** "How *Chlamydomonas* keeps track of the light once it has reached the right phototactic orientation." *Biophys J* 73(3): 1562-72.

**Sineshchekov, O. A., K. H. Jung and J. L. Spudich (2002).** "Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13): 8689-94.

**Snell, W. J., J. Pan and Q. Wang (2004).** "Cilia and flagella revealed: from flagellar assembly in *Chlamydomonas* to human obesity disorders." *Cell* 117(6): 693-7.



**Stevens, D. R., J. D. Rochaix and S. Purton (1996).** "The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*." *Mol Gen Genet* 251(1): 23-30.

**Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and J. W. Dubendorff (1990).** "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* 185: 60-89.

**Sueoka, N., K. S. Chiang and J. R. Kates (1967).** "Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores." *J Mol Biol* 25(1): 47-66.

**Suzuki, T., K. Yamasaki, S. Fujita, K. Oda, M. Iseki, K. Yoshida, M. Watanabe, H. Daiyasu, H. Toh, E. Asamizu, S. Tabata, K. Miura, H. Fukuzawa, S. Nakamura and T. Takahashi (2003).** "Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization." *Biochem Biophys Res Commun* 301(3): 711-7.

**Takahashi, T. and M. Watanabe (1993).** "Photosynthesis modulates the sign of phototaxis of wild-type *Chlamydomonas reinhardtii*. Effects of red background illumination and 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea." *FEBS Lett* 336(3): 516-20.

**Tam, L. W. and P. A. Lefebvre (1993).** "Cloning of flagellar genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by DNA insertional mutagenesis." *Genetics* 135(2): 375-84.

**Uhl, R. and P. Hegemann (1990).** Adaptation of *Chlamydomonas* phototaxis. I. A light scattering apparatus for measuring the phototactic rate of microorganisms with high time resolution. *Cell Motil Cytoskeleton* 15: 230-244.

**Zalacain, M., F. Malpartida, D. Pulido and A. Jimenez (1987).** Cloning and expression in *Escherichia coli* of a hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygrosopicus*. *Eur J Biochem* 162(2): 413-8.

## 7 Lebenslauf

Name: Berthold  
Vorname: Peter Xaver  
Geburtsdatum: 19.11.1974  
Geburtsort: Regensburg  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung

1981 – 1985 Grundschule Königswiesen in Regensburg  
1985 – 1994 Musikgymnasium der Regensburger Domspatzen

### Zivildienst

1994 – 1995 in Regensburg

### Akademischer Werdegang

1995 – 2000 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Regensburg

2000 – 2001 Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität Regensburg  
unter Anleitung von Prof. Dr. Rüdiger Schmitt  
Thema: Entwicklung eines neuen Transformationsmarkers für  
*Chlamydomonas reinhardtii*: Expression der Hygromycin B-  
Phosphotransferase aus *Streptomyces hygrosopicus*

2002 – 2006 Dissertation am Institut für Biochemie I der Universität Regensburg  
unter Anleitung von Prof. Dr. Peter Hegemann  
Thema: Untersuchung der Funktion des Photorezeptors  
*Channelrhodopsin 1* in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

seit 2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut Biologie – Experimentelle  
Biophysik der Humboldt Universität Berlin unter Leitung von Prof.  
Dr. Peter Hegemann

## Danksagung

Prof. Peter Hegemann danke ich für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und der spannenden Arbeitsmethoden sowie der vielfältigen Anregungen und Diskussionen, die für das Gelingen dieser Arbeit unverzichtbar waren.

Wolfgang Mages gilt mein Dank für seine unermüdliche wissenschaftliche und mentale Unterstützung während meiner ganzen Arbeit.

Tina Schiereis möchte ich recht herzlich für Ihre Unterstützung im Labor und für die nachmittäglichen Kaffeekränzchen danken.

Christoph Griesbeck, Markus Heitzer und Alke Eichler-Stahlberg gilt mein Dank für die zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen.

Gerda Treuner danke ich für die Hilfe bei der Immunfluoreszenz.

Norbert, Gerhard, Eddi und Ingrid sowie den restlichen Mitgliedern des Lehrstuhls Biochemie I sei Dank für all ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Yinghong Lu danke ich für die ein oder anderen chinesischen Spezialitäten und für die Einblicke in das Reich der Mitte.

Den Mitgliedern der neuen Arbeitsgruppe in Berlin (Tilo, Heide, Maila, Margrit, Dr. Hagedorn, Gabi, Satoshi, Christina und Frau Piater) danke ich für die herzliche Aufnahme.

Meiner Mutter Cordula möchte ich für Ihr Vertrauen und Ihre Unterstützung, die sie mir Zeit meines Lebens entgegengebracht hat, ganz besonders danken.

Der größte Dank gilt meiner Sabinka, die so manch schwere Stunde mit mir ertragen musste und mich immer wieder aus den unergründlichen Tiefen der Verzweiflung rettete.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Daten sind als solche kenntlich gemacht.

Peter Berthold